

**Das nephrogenetische Potential der
Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und
pax8 in *Xenopus* animalen Kappen und ihre
Vernetzung in der Nephrogenese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Christiane Drews
aus Recklinghausen

September 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg Essen, Standort Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2010

Teile dieser Arbeit sind in der Publikation „The nephrogenic potential of the transcription factors *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* and *pax8* assessed in *Xenopus* animal caps“ enthalten. Die Publikation wurde bei der Zeitschrift „BMC Developmental Biology“ eingereicht.

Abkürzungen

ActA	Aktivin A
ARE	Aktivin responsives Element
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
C _T	threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis -(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
hCG	humanes Chorion-Gonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEK	humane embryonale Nierenzellen
hnf	Hepatocyte Nuclear Factor
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
kDa	Kilodalton
lhx	LIM homeobox
Luc	Luciferase
MMR	Marc's Modified Ringer
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS 222	Tricain Methansulfonat
odc	Ornithin-Decarboxylase

osr	odd-skipped related
pax	paired-box
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RA	Retinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transforming growth factor

Für eine einfache Unterscheidung wurden in dieser Arbeit die humanen Gene in Großbuchstaben, die Gene der Maus mit großem Anfangsbuchstaben und die *Xenopus* Gene klein geschrieben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Die Nierenentwicklung in Vertebraten	9
1.2	Die Pronephrosentwicklung in <i>Xenopus laevis</i>	10
1.3	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus zur Studie der Nierenentwicklung...	12
1.4	Der animale Kappen-Test	14
1.5	Eukaryotische Transkriptionsregulation	16
1.6	Die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren <i>osr1</i> , <i>osr2</i> , <i>hnf1b</i> , <i>lhx1</i> und <i>pax8</i>	18
1.6.1	Die odd-skipped related Gene <i>osr1</i> und <i>osr2</i>	18
1.6.2	Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor <i>hnf1b</i>	19
1.6.3	Die Transkriptionsfaktoren <i>lhx1</i> und <i>pax8</i>	20
1.7	Zielsetzung.....	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	24
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	24
2.3	Expressionsvektoren	24
2.4	Funktions- und Expressionsanalysen der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in <i>Xenopus laevis</i>	26
2.4.1	<i>in vitro</i> Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>	26
2.4.2	<i>In vitro</i> Synthese von mRNA.....	27
2.4.3	mRNA Injektion	27
2.4.4	Präparation und Kultur von animalen Kappen.....	28
2.4.5	Immunfluoreszenz der Pronephri in <i>Xenopus laevis</i> Larven und animalen Kappen.....	29
2.4.6	RNA Isolierung und cDNA-Synthese	30
2.4.7	Quantitative realtime-PCR	30
2.4.8	Nachweis der überexprimierten Proteine mittels Western Blot	33
2.5	Identifikation einer HNF1 Bindestelle im <i>lhx1</i> Gen	34
2.5.1	Zellkultur und Luciferase-Assay.....	34
2.5.1.1	Zellkultur von HEK293 (HNF1B) Zellen	34
2.5.1.2	Transiente Transfektion und Luciferase-Assay.....	34
2.5.2	Luciferase-Assay in animalen Kappen	35
2.6	Mikroarrayanalyse	35
2.6.1	RNA Isolierung für Mikroarray	36
2.6.2	cDNA-Synthese, Markierung und Hybridisierung	36
2.6.3	Auswertung der Daten	37

2.7	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Etablierung des animalen Kappen-Tests zur Analyse der Pronephros- entwicklung	39
3.2	Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen	42
3.2.1	Zeitabhängige Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptions- faktoren in animalen Kappen.....	42
3.2.2	Identifizierung von <i>osr2</i> Splicevarianten in <i>Xenopus</i>	43
3.2.3	Identifikation induzierter Gene in animalen Kappen mittels Mikroarray	46
3.2.4	Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in Aktivin A oder Retinsäure induzierten animalen Kappen	51
3.3	Überexpression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren	52
3.3.1	Überexpression des humanen OSR1 und des Osr2A der Maus in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	52
3.3.2	Überexpression des humanen OSR1 in animalen Kappen	55
3.3.3	Überexpression des humanen PAX8 und/oder LHX1 in animalen Kappen	58
3.3.4	Überexpression des humanen HNF1B in animalen Kappen.....	60
3.4	Induktion wichtiger Gene der Nephrogenese in HNF1B überexprimieren- den animalen Kappen	62
3.5	Identifikation einer funktionellen HNF1 Bindestelle in der Promotorregion von <i>lhx1</i>	65
3.5.1	Identifikation möglicher HNF1 Bindestellen in <i>lhx1</i>	65
3.5.2	Aktivierung der <i>lhx1</i> -Reporterkonstrukte in HEK293 (HNF1B) Zellen.....	66
3.5.3	Aktivierung der <i>lhx1</i> -Reporterkonstrukte in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen.....	69
4	Diskussion	71
4.1	Das animale Kappen-Testsystem	71
4.2	Statistische Beurteilung der Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen	74
4.3	Die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren werden durch Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert.....	75
4.4	Wichtige Faktoren der Mesodermentwicklung und der Nephrogenese werden in animalen Kappen induziert	78
4.5	Die Überexpression von OSR1 und Osr2A zeigt einen vergleichbaren Effekt auf die Pronephrosentwicklung	82

4.6	OSR1, LHX1 und/oder Pax8 und HNF1B können keine Pronephros- differenzierung in animalen Kappen induzieren	83
4.7	HNF1B induziert wichtige Faktoren der Nephrogenese in animalen Kappen.....	84
4.8	Die Regulation von <i>lhx1</i> durch <i>hnf1b</i> über eine HNF1 Bindestelle ist evolutionär konserviert	86
4.9	Das regulatorische Netzwerk der frühen nephrogenetischen Transkrip- tionsfaktoren in der Nephrogenese	87
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis.....	94
7	Anhang	113
8	Danksagung	115

1 Einleitung

1.1 Die Nierenentwicklung in Vertebraten

In höheren Vertebraten sind drei Nierenformen bekannt, die sich sukzessiv voneinander ableiten: Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Alle besitzen die gleichen funktionellen Einheiten, die Nephronen. Allerdings ist jede dieser Nierenformen komplexer als die jeweils vorherige und unterscheidet sich in der Anzahl und Organisation der Nephronen (Vize et al., 2003).

Die Niere mit dem einfachsten Aufbau ist der Pronephros (Abb. 1 links) und stellt die funktionelle Niere der aquatisch lebenden Larven von Fischen und Amphibien dar. Der Pronephros wird in der späteren Entwicklung durch den Mesonephros (Abb. 1 Mitte), bestehend aus 10 bis 50 Nephronen, ersetzt. In höheren Vertebraten entwickelt sich der Pronephros nur als ein rudimentäres Organ. Die erste funktionelle Niere ist hier der Mesonephros, der durch den Metanephros (Abb. 1 rechts), die adulte Niere, ersetzt wird. Trotzdem ist die Ausbildung aller drei Nierenformen essentiell, da jedes nachfolgende Organ sich aus dem vorherigen entwickelt (Saxén, 1987).

Der Pronephros besteht aus nur einem Nephron, das sich aus drei Hauptkomponenten zusammensetzt (Abb. 1 links): Glomus, Nierenkanälchen (Tubuli) und Sammelrohr (Ductus). Der Glomus ist die vaskuläre Filtrationseinheit des Pronephros, durch die das Blut gepresst wird, so dass der Primärharn entsteht. Der Primärharn gelangt ins Zoelom, in welches drei Nephrostome, Cilien-besetzte Trichter, münden. Diese befördern durch Cilienschlag den Primärharn in die Tubuli. In den Tubuli findet die Resorption von Ionen, Wasser, Nährstoffen und anderen wichtigen Molekülen statt. Die übrige Flüssigkeit wird durch den Ductus zur Cloake geführt und ausgeschieden (Vize et al., 1997).

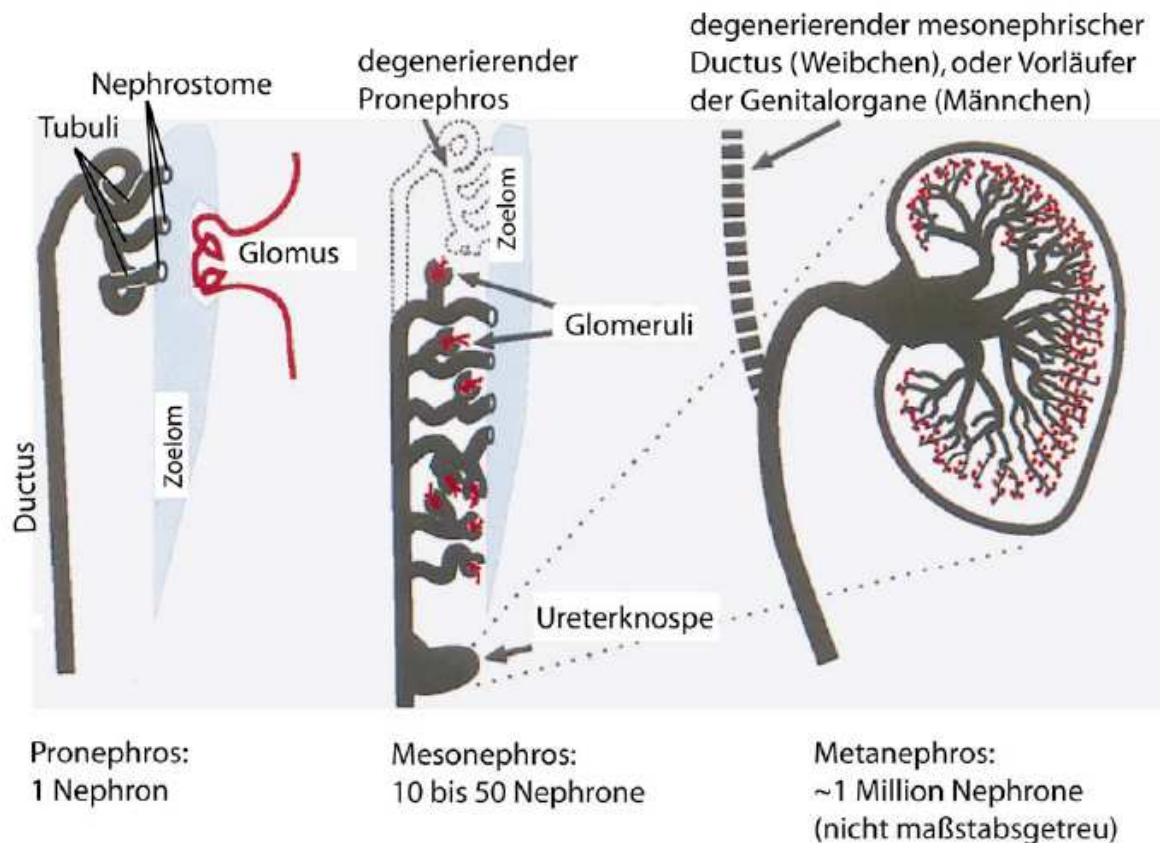


Abb. 1: Die drei sukzessiv auftretenden Nierenformen der Vertebraten: Pronephros, Mesonephros und Metanephros (modifiziert nach Vize et al., 1997). Beschreibung siehe Text.

Da die gleichen Regulatoren während der Entwicklung des Pronephros beim Frosch und der Niere höherer Vertebraten exprimiert werden, ist der Pronephros ein gutes Modell, um die molekularen Ereignisse und die Schlüsselmoleküle in der Nierenentwicklung zu studieren (Carroll et al., 1999; Ryffel, 2003; Jones, 2005; Chan and Asashima, 2006).

1.2 Die Pronephrosentwicklung in *Xenopus laevis*

Im *Xenopus laevis* entwickelt sich der Pronephros innerhalb von fünf Tagen aus dem intermediären Mesoderm, welches sich zwischen dem paraxialen Mesoderm und der lateralen Platte befindet (Dressler, 2009). Die Signale, die das unspezifizierte intermediäre Mesoderm benötigt, um die Pronephrosanlage zu entwickeln, sind bisher unbekannt. Experimente haben allerdings gezeigt, dass die anterioren Somiten essentiell für die Pronephrosentwicklung sind. Werden sie vollständig entfernt (Seufert et al., 1999) oder vom zukünftigen Pronephros separiert (Mauch et

al., 2000), so entwickelt sich kein Pronephros mehr. Umgekehrt können die anterioren Somiten die Bildung von Tubuli im unspezifizierten intermediären Mesoderm induzieren (Seufert et al., 1999). Obwohl der exakte Zeitpunkt und die Art des Signals, welches von den Somiten ausgesendet wird, unbekannt sind, wird seit kurzem angenommen, dass *wnt11b* dieses entscheidende Signal ist. *Wnt11b* wird in den anterioren Somiten und während der Pronephrosentwicklung exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Nierenentwicklung, wie die Inhibition von *wnt11b* *in vivo* mit der daraus resultierenden Reduktion der Pronephrosstrukturen zeigt. In Holtfreter-Sandwich-Kulturen kann *wnt11b* unspezifiziertes intermediäres Mesoderm zur Pronephrosdifferenzierung induzieren (Tételin and Jones, 2010). Dies zeigt deutlich, dass *wnt11b* das Potential zur Induktion der Pronephrosentwicklung hat. Unklar bleibt aber, ob das intermediäre Mesoderm direkt oder indirekt von *wnt11b* beeinflusst wird und ob noch weitere bisher unbekannte Signale beteiligt sind. In Abbildung 2 ist die Pronephrosentwicklung mit den exprimierten Genen schematisch dargestellt.

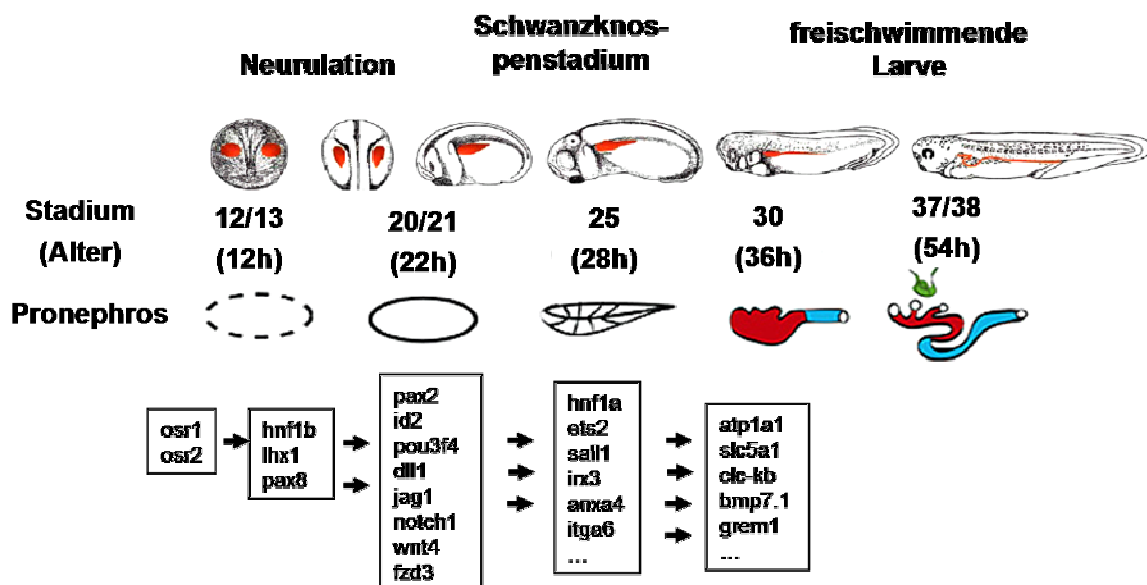


Abb. 2: Beginn der Genexpression im *Xenopus* Pronephros. Die rot gefärbten Regionen in den schematischen Darstellungen der *Xenopus* Larven (in der Abbildung im oberen Bereich) stellen den sich entwickelnden Pronephros in den verschiedenen darunter genannten Stadien dar. Darunter ist die Struktur der Pronephrosanlage bis hin zum voll entwickelten Organ in den verschiedenen Entwicklungsstadien schematisch gezeigt (rot: Tubuli; blau: Ductus; grün: Glomus). Der Beginn der Genexpression bestimmter Gene ist den spezifischen Entwicklungsstadien des Pronephros zugeordnet (modifiziert nach Ryffel, 2003). Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Die Spezifizierung des Mesoderms zu Vorläuferzellen des Pronephros erfolgt bereits in der frühen Neurula (Stadium 12/13; Nieuwkoop and Faber, 1975). Zu diesem Zeitpunkt werden die Transkriptionsfaktoren *osr1* und *osr2* (Tena et al., 2007), *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* (Ryffel, 2003) exprimiert, die eine zentrale Rolle in der Nierenentwicklung spielen und in späteren Entwicklungsstadien als Marker für die Tubuli und den Ductus fungieren. Eine erste zelluläre Differenzierung kann hingegen erst in der späten Neurula (Stadium 20/21) beobachtet werden, in der es zu einer Verdickung der somatischen Zellen der lateralen Platte nahe den Somiten kommt. Ab diesem Stadium werden die für die Entwicklung des Ductus wichtigen Transkriptionsfaktoren *pax2*, *id2* und *pou3f4* sowie Proteine des Notch-Signalweges (*dll1*, *jag1* und *notch1*) und des Wnt-Signalweges (*wnt4* und *fzd3*), welche bei der Entwicklung der Tubuli eine Rolle spielen, exprimiert. Ab dem Schwanzknospenstadium (Stadium 25) ist die Pronephrosanlage zu erkennen, die aus radial angeordneten Zellen besteht und sich durch die Expression von *hnf1a*, *ets2*, *sall1*, *irx3*, *anxa4* und *itga6* auszeichnet. In der freischwimmenden Larve (Stadium 30 bis 38) teilt sich diese Anlage in Tubuli und Ductus auf. Jetzt wird auch die dritte Komponente des Pronephros, der Glomus, gebildet, der aus dem viszeralem Mesoderm entsteht (Bernardini et al., 1999). Ein Markerprotein des Glomus ist der Wilms Tumorfaktor 1 (*wt1*), der bereits in der späten Neurula exprimiert wird. Ab Stadium 30 werden die Natrium-Kalium-ATPase *atp1a1*, sowie der Glukose-Cotransporter *slc5a1* und der Chlorid-Ionenkanal *clc-kb* exprimiert, die für die Resorptionsfunktion des Pronephros notwendig sind. In der Glomusanlage beginnt zu diesem Zeitpunkt die Expression von *vegf* (vascular endothelial growth factor). Im Stadium 38 ist der Pronephros ausdifferenziert (Ryffel, 2003; Jones, 2005).

1.3 *Xenopus laevis* als Modellorganismus zur Studie der Nierenentwicklung

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* stellt einen attraktiven Modellorganismus dar, um die Entwicklung von Vertebraten auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen. Gegenüber höher entwickelten Vertebraten weist er viele Vorteile auf: So können die Frösche einfach in Aquarien gehalten und gezüchtet werden. Die Ablage von bis zu 3000 Eiern pro Weibchen kann alle drei Monate durch Injektion des humanen Chorion-Gonadotropin (hCG) induziert werden. Diese große

Menge an Eiern ermöglicht es, die Entwicklung durch gleichzeitige *in vitro* Befruchtung mehrerer Eier zu synchronisieren, so dass mehrere Larven im gleichen Entwicklungsstadium beobachtet und verglichen werden können (Sive et al., 2000; Olive et al., 2003; Ryffel, 2003). Ein weiterer Vorteil ist, dass die robusten Larven sich außerhalb der Mutter in einer einfachen Salzlösung oder Wasser entwickeln, wodurch sie einfach manipulierbar sind. Da die Larven transparent sind, lässt sich die Organogenese leicht analysieren. Bereits nach zwei bis drei Tagen hat sich eine freischwimmende Larve mit vollkommen funktionsfähigen Organen entwickelt.

Eine klassische Methode zur Identifikation wichtiger Moleküle in der Organogenese von *Xenopus laevis* oder zur Funktionsanalyse spezifischer Proteine ist die Injektion von DNA oder mRNA in das befruchtete Ei oder in Blastomere der frühen Entwicklungsstadien (Sive et al., 2000). Durch die Auswahl der Blastomere kann bestimmt werden, in welchen Teilen des Embryos das Protein exprimiert wird. So ist es z.B. möglich die mRNA in nur eine Blastomere im Zweizellstadium zu injizieren, so dass die Manipulation auf eine Seite des Embryos beschränkt ist und die andere Seite als Kontrolle im selben Tier fungieren kann. Zur Identifizierung der injizierten Bereiche wird als Markierung z.B. RNA für das grün fluoreszierende Protein (GFP) mit injiziert, dessen grüne Fluoreszenz bereits im Blastulastadium zu sehen ist.

Bei der DNA-Injektion erfolgt die Genexpression frühestens mit Beginn der zygotischen Transkription im Blastulastadium 8,5. Dies bedeutet, dass der Einfluss auf frühere Entwicklungsstadien nicht untersucht werden kann. Dagegen wird die injizierte mRNA unmittelbar nach der Injektion translatiert, was die Manipulation früher Entwicklungsstadien ermöglicht. Allerdings sind die injizierten Nukleinsäuren nicht dauerhaft stabil, was zur Folge hat, dass nach einigen Tagen kein Protein mehr überexprimiert wird. Gene können aber nicht nur überexprimiert werden, die Genexpression kann auch durch synthetisch hergestellte Nukleinsäuren, so genannte Morpholinos, spezifisch gehemmt werden (Heasman, 2002).

Um auch spätere Entwicklungsstadien zu untersuchen, können außerdem unter erheblich größerem Aufwand transgene *Xenopus laevis* hergestellt werden. Dabei wird das Transgen stabil ins Genom integriert (Kroll and Amaya, 1996) und kann konditional aktiviert werden, um die Funktion eines Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung zu analysieren (Jones, 2005).

Weitere Methoden zur Analyse der Embryogenese stellen Transplantationsexperimente sowie die Induktion von Gewebeentwicklung in Explantaten des animalen Pols der späten Blastula, den animalen Kappen, dar (s. 1.4).

Mittels der oben genannten Methoden konnten bereits viele Schlüsselmoleküle der Embryogenese, unter anderen viele nephrogenetische Regulatoren, charakterisiert werden (Brändli, 1999; Ryffel, 2003; Jones, 2005).

1.4 Der animale Kappen-Test

Das presumptive Ektoderm kann in der späten Blastula von *Xenopus* Embryonen isoliert und diese so genannten animalen Kappen für die Analyse der Zellinduktion *in vitro* genutzt werden. Die Isolation der animalen Kappe kann mittels scharfer Pinzetten, Haarschlaufen oder kurzzeitig stark erhitzter Platinschlaufen (Gastromaster) erfolgen. Die isolierten embryonalen Zellen sind pluripotent und können durch verschiedene Faktoren zur Differenzierung induziert werden (Okabayashi and Asashima, 2003; Asashima et al., 2009). Werden sie nur in einfacher Salzlösung kultiviert, so entwickelt sich atypische Epidermis. Behandelt man dagegen die animalen Kappen z.B. mit dem Wachstumsfaktor Aktivin A, bilden sich abhängig von der Konzentration oder Kombination mit weiteren Faktoren die verschiedensten Gewebetypen aus (Abb. 3).

Werden animale Kappen z.B. in Aktivin A (10ng/ml) und Retinsäure (10^{-4} M) inkubiert, kommt es zur Differenzierung in Pronephros gewebe (Moriya et al., 1993). In diesen induzierten animalen Kappen konnte mittels spezifischer Marker gezeigt werden, dass sich Strukturen entwickeln, die sowohl Tubuli (Moriya et al., 1993) als auch Ductus (Osafune et al., 2002) und Glomus (Brennan et al., 1999) repräsentieren. Die Funktionalität dieser *in vitro* induzierten Pronephri konnte durch Transplantation in Embryonen, deren Pronephrosanlage zuvor entfernt wurde, gezeigt werden (Chan et al., 1999). Des Weiteren wurde festgestellt, dass in diesen behandelten animalen Kappen für die Pronephrosdifferenzierung charakteristische Gene in der gleichen Reihenfolge und nahezu zur gleichen Zeit exprimiert werden wie während der normalen Entwicklung (Uochi and Asashima, 1996; Brennan et al., 1999; Osafune et al., 2002).

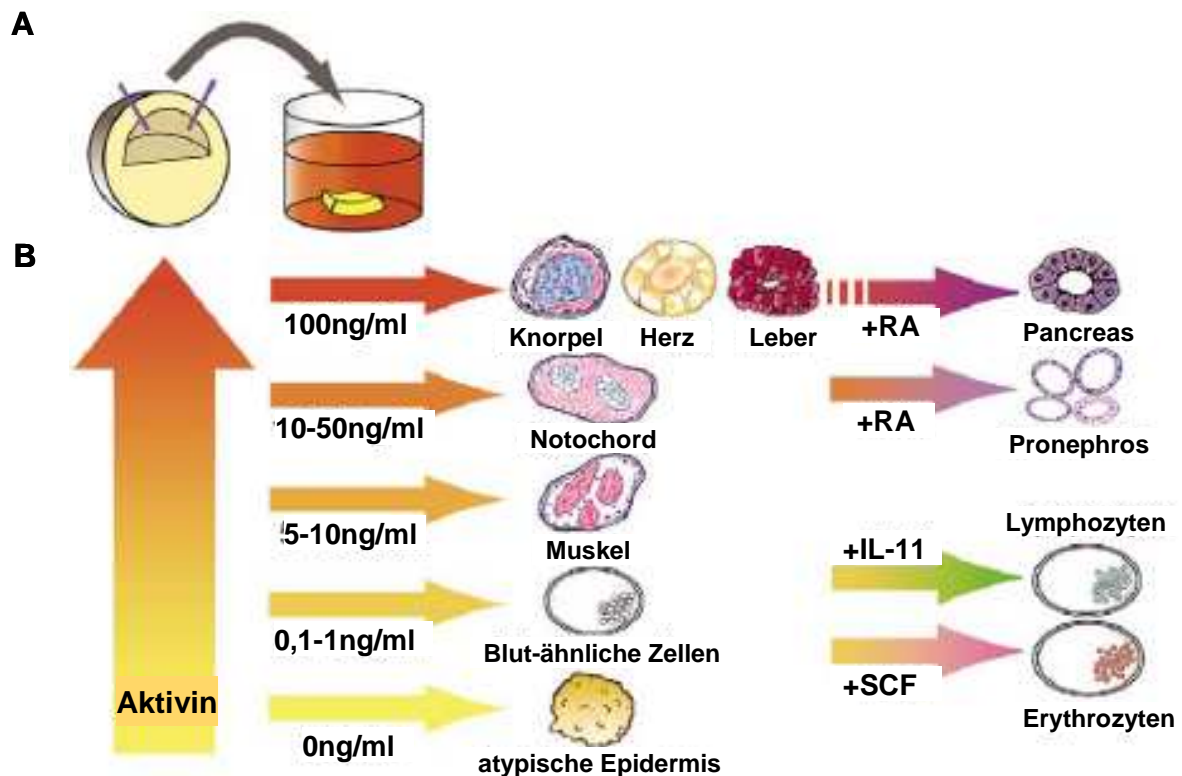


Abb. 3: Gewebeinduktion in animalen Kappen. (A) Durchführung des animalen Kappen-Tests: Die ektodermalen Zellen des animalen Pols von *Xenopus* Embryonen in der späten Blastula (animale Kappe) werden entfernt und in einer Salzlösung, die Induktoren enthält, kultiviert. (B) zeigt die schematische Darstellung der Gewebetypen, die in animalen Kappen durch Aktivin A oder andere Faktoren induziert werden können. RA: Retinsäure; IL-11: Interleukin-11; SCF: Stammzellfaktor (modifiziert nach Okabayashi and Asashima, 2003).

Die *in vitro* Induktion von Pronephrosgewebe in animalen Kappen ermöglicht es, die Funktion und Verknüpfung wichtiger nephrogenetischer Faktoren zu analysieren und Signalwege zu identifizieren. So wurde z.B. gezeigt, dass der Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) zusammen mit Retinsäure nur Glomus induzieren kann, aber nicht Tubuli und Ductus wie Aktivin A und Retinsäure in Kombination (Brennan et al., 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene Signalwege an der Entwicklung des Glomus auf der einen und der Tubuli und des Ductus auf der anderen Seite beteiligt sind.

Ebenfalls ist es möglich, durch Überexpression von Genen die Gewebedifferenzierung in animalen Kappen zu induzieren und so Faktoren zu identifizieren, die für die Differenzierung *in vivo* von Bedeutung sind. Auf diese Weise wurde z.B. heraus-

gefunden, dass überexprimiertes Sox1 (Nitta et al., 2006) oder Zic3 (Nakata et al., 1997) neurales Gewebe in animalen Kappen induzieren kann.

1.5 Eukaryotische Transkriptionsregulation

Die Regulation der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in Eukaryoten während der Entwicklung, der Differenzierung und Aufrechterhaltung von Zellfunktionen. Diese Kontrolle kann auf vielen möglichen Ebenen erfolgen: (1) Chromatinstruktur, (2) Transkriptionsstart, (3) Transkriptmodifikationen, (4) Transport ins Cytoplasma, (5) Translation, (6) RNA-Stabilität und (7) Proteinaktivität (Villard, 2004).

Ein wichtiger Punkt in der Transkriptionsregulation ist die Organisation des Chromatins. Die enorme Menge an DNA in eukaryotischen Zellen muss so verpackt werden, dass sie in den nur wenige Mikrometer großen Zellkern passt. Das erfordert eine hoch organisierte Komprimierung. Gleichzeitig muss weiterhin gewährleistet sein, dass die Transkription der Gene erfolgen kann. Im Zellkern bildet die DNA zusammen mit basischen Proteinen, den Histonen, das so genannte Chromatin. Das Chromatin setzt sich aus sich periodisch wiederholenden Untereinheiten, den Nukleosomen, zusammen, in denen 146bp des DNA-Doppelstranges um ein Oktamer aus den basischen Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewunden ist. Der Abschnitt, der die Nukleosomen mit einander verbindet, wird „Linker“ genannt und hat eine Länge von etwa 20 bis 100bp, je nach Sequenzkontext, Organismus und Gewebe. Das fünfte und letzte Histon H1 bindet sowohl an die Nukleosomen als auch an die Linker-DNA und bildet durch Wechselwirkung mit anderen H1-Molekülen eine noch kompaktere Struktur, die 30nm-Faser. Man nimmt an, dass in der nächst höheren Organisationsstufe des Chromatins die 30nm-Fasern periodisch in großen Abständen (10.000 bis 100.000bp) in Schlaufen an die Kernmatrix angeheftet sind (Hörz, 1994). Jede Schlaufe bildet so eine unabhängige, funktionelle Einheit. Es gibt zwei unterschiedlich dichte Packungszustände des Chromatins, die die Zugänglichkeit und damit die Expression der dort lokalisierten Gene beeinflussen. Während der Interphase liegt das Heterochromatin stark kondensiert vor und ist weitgehend transkriptionsinaktiv. Das Euchromatin dagegen liegt nur schwach kondensiert vor und ist der Ort der aktiven Genexpression. Histonacetylierungen (Kingston et al., 1996) und der Status der Genmethylierungen (Emerson, 2002) sind zwei Mechanis-

men, die die Chromatinstruktur und damit die Transkribierbarkeit eines Genes beeinflussen können.

Eine weitere wichtige Regulationsebene der Expression ist die Transkriptionsinitiation. Dabei sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Zum Umschreiben der DNA in mRNA, die für das Protein kodiert, benötigt die RNA-Polymerase II die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Diese generellen, in jeder Zelle vorhandenen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF und TFIIH), kurz GTFs, bilden einen aktiven Initiationskomplex und rekrutieren die RNA-Polymerase II (Tjian, 1996; Villard, 2004; Thomas and Chiang, 2006). Neben den ubiquitären Transkriptionsfaktoren gibt es zell- bzw. gewebespezifische Transkriptionsfaktoren. In Kombination mit den GTFs sorgen diese spezifischen Faktoren nicht nur für die generelle Proteinausstattung der Zelle, sondern auch für die Expression zellspezifischer Proteine, die in anderen Zelltypen nicht vorhanden sind. So sind z.B. Aktin und Myosin in Muskelzellen exprimiert. Die Anlagerung der spezifischen Transkriptionsfaktoren an das zu regulierende Gen erfolgt an spezifische Erkennungssequenzen, die so genannten cis-Elemente, die sich sowohl in der Promotorregion als auch einige 100 bis 1000 Basenpaare vom Promotor entfernt befinden können (Orphanides et al., 1996; Villard, 2004). Je nachdem, ob der gebundene Faktor die Transkription aktiviert oder hemmt, wird er Aktivator (Bindung an Enhancer-Element) oder Repressor (Bindung an ein Silencer-Element) genannt. An ein Gen können viele Transkriptionsfaktoren gleichzeitig binden, die miteinander und auch mit weiteren Cofaktoren der Transkription wechselwirken können. So entsteht ein Multiproteinkomplex, der die Transkription steuert.

Interessanterweise sorgen Transkriptionsfaktoren nicht nur für eine Spezifizierung der Zellen, sondern können außerdem dazu eingesetzt werden, differenzierte Zellen zu undifferenzierten Zellen zurückzuprogrammieren, was vor einigen Jahren zu einem Durchbruch in der Stammzellforschung führte. So bewirkt die virale Transduktion von nur vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc) eine Reprogrammierung von murinen (Takahashi and Yamanaka, 2006; Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007) und auch humanen (Takahashi et al., 2007; Lowry et al., 2008) somatischen Zellen zu so genannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS). Des Weiteren können humane somatische Zellen auch mit einer anderen Kombination an Faktoren (Oct4, Sox2, Nanog und Lin28) reprogrammiert werden (Yu et al., 2007). Die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Sox2

sind allerdings bei allen Reprogrammierungen unerlässlich. Werden alle sechs Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4, Nanog, Lin28 und c-Myc) eingesetzt, so steigert dies die Effizienz der Bildung von iPS Zellen aus humanen somatischen Zellen (Liao et al., 2008).

1.6 Die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8*

Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* spielen die fünf Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2* (Tena et al., 2007), *hnf1b* (Demartis et al., 1994), *lhx1* (*lim1*) (Taira et al., 1992) und *pax8* (Heller and Brändli, 1999) eine wesentliche Rolle in der Nierenentwicklung. Diese fünf Faktoren werden im Laufe dieser Arbeit als die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren bezeichnet, da sie im Neurulastadium in der Pronephrosanlage vor der zellulären Differenzierung der Niere exprimiert werden und darüber hinaus eine Deletion oder Überexpression dieser Faktoren die Nierenentwicklung stark beeinflusst.

1.6.1 Die odd-skipped related Gene *osr1* und *osr2*

Die odd-skipped Gene wurden als erstes in *Drosophila* identifiziert und sind evolutionär konservierte Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren. Mutationen im so genannten Paar-Regel(pair-rule)-Gen *odd* führen zum Fehlen der ungeraden Segmente in der anterioren Region in *Drosophila* Embryonen (Coulter and Wieschaus, 1988). In *Drosophila* besteht die odd-skipped Genfamilie aus den vier Transkriptionsfaktoren *odd*, *sob*, *bowl* und *drm* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Hart et al., 1996; Liu et al., 1999), während es in Säugern dagegen nur zwei odd-skipped related Gene, *Osr1* (So and Danielian, 1999; Katoh, 2002) und *Osr2* (Lan et al., 2001) mit den Splicevarianten *Osr2A* und *Osr2B* (Kawai et al., 2005), gibt. Versuche in *Xenopus laevis* Embryonen zeigen deutlich die bedeutende Rolle von *osr1* und *osr2* in der Nierenentwicklung. Die Inhibition von *osr1* oder *osr2* durch Morpholinos führt zu starken Nierendefekten bis hin zum völligen Verlust aller Nierenstrukturen. Dagegen entstehen durch Überexpression der jeweiligen Faktoren vergrößerte Pronephri und ektopisches Nierengewebe, in dem die frühen Nierenmarker *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* exprimiert sind (Tena et al., 2007). Gleiche Ergebnisse

wurden ebenfalls im Zebrafisch erzielt (Tena et al., 2007). Des Weiteren konnten Tena et al. (2007) zeigen, dass auch das *Drosophila* odd in *Xenopus* Embryonen die Bildung ektopischen Nierengewebes induzieren kann.

Wird in Mäusen *Osr1* homozygot deletiert, so kommt es in den Embryonen zur reduzierten Expression von *Lhx1* und *Pax2* im intermediären Mesoderm, zur Apoptose des nephrogenetischen Mesenchyms und damit zum Fehlen der Nierenstrukturen (Wang et al., 2005; James et al., 2006). Darüber hinaus konnte in diesen Mäusen gezeigt werden, dass *Osr1* eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Herzens und der Geschlechtsorgane spielt (Wang et al., 2005). Eine homozygote Deletion von *Osr2* in Mäusen führt zu Embryonen mit einer Gaumenspalte und bei der Geburt bereits geöffneten Augen (Lan et al., 2004). Dies lässt darauf schließen, dass *Osr2* in Säugern eine wichtige Rolle in der kraniofazialen Entwicklung spielt. Die Nierenentwicklung verläuft in diesen Mutanten völlig normal (Lan et al., 2004), obwohl *Osr2* Transkripte in der sich entwickelnden Niere exprimiert sind (Lan et al., 2001). *Osr2* scheint, anders als im *Xenopus* und Zebrafisch, in Mäusen für die Nierenentwicklung entbehrlich zu sein (Lan et al., 2004). Weitere Funktionen von *Osr2* konnten in der Entwicklung der Extremitäten, der Zähne und der Knochen gezeigt werden (Lan et al., 2001; Lan et al., 2004; Kawai et al., 2007; Zhang et al., 2009).

1.6.2 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor *hnf1b*

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Nierenentwicklung ist der gewebespezifische Homeodomänen-Transkriptionsfaktor HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) 1B, der erstmalig in Zellextrakten aus dedifferenzierten Ratten-Hepatoma-Zelllinien durch Bindung an den Albuminpromotor entdeckt wurde (Cereghini et al., 1988) und vom Zebrafisch bis zum Menschen hoch konserviert ist (Frain et al., 1989; Demartis et al., 1994; Deryckere et al., 1995; Sun and Hopkins, 2001).

Die Überexpression sowohl des *Xenopus* *hnf1b* (Wu et al., 2004) als auch des humanen HNF1B (Wild et al., 2000) hat in *Xenopus* Embryonen eine signifikante Reduktion der Pronephrosgröße bis hin zum völligen Fehlen einer Niere zur Folge. Diese identischen Phänotypen von *hnf1b* und humanen HNF1B in *Xenopus* deuten darauf hin, dass das regulatorische Potential von HNF1B evolutionär in Vertebraten konserviert ist. Ein vergleichbarer Phänotyp ergab sich, wenn die HNF1B Mutante P328L329del, die in Menschen mit Nierendefekten gefunden wurde, überexprimiert

wurde. Die HNF1B Mutante A263insGG hingegen führt zu einer Vergrößerung des Pronephros (Bohn et al., 2003; Wu et al., 2004).

Mäuse, in denen Hnf1b homozygot deletiert ist, sterben noch vor der Gastrulation. Diese Letalität wird durch eine fehlerhafte Differenzierung des visceralen Endoderms verursacht (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Um das Problem der frühen embryonalen Letalität zu umgehen, wurde eine konditionale nierenspezifische Deletion von Hnf1b zur Untersuchung der Hnf1b Funktion eingesetzt. Diese führt zur Zystenbildung in den Nieren, der so genannten „Polyzystischen Nierenerkrankung“ PKD (vom engl. *Polycystic Kidney Disease*) (Gresh et al., 2004). Heterozygote Deletionen von Hnf1b dagegen beeinträchtigen die Entwicklung der Mausedembryonen nicht (Coffinier et al., 1999). Im Menschen jedoch verursachen bereits heterozygote HNF1B Mutationen verschiedene Fehlbildungen der Niere wie z.B. das Fehlen einer Niere, renale Hypoplasie und Dysplasie, hyperurikämische Nephropathie und Zystenbildung (Edghill et al., 2006). Treten Diabetes und renale Zysten gemeinsam im Menschen mit HNF1B Mutationen auf, so wird dieses Krankheitsbild RCAD (**renal cysts and diabetes**) Syndrom genannt (Bingham et al., 2001; Kolatsi-Joannou et al., 2001).

HNF1B wird nicht nur in der Niere, sondern auch in vielen weiteren Organen wie der Leber, dem Magen-Darm-Trakt, der Lunge, der Bauchspeicheldrüse und im Genitaltrakt exprimiert (Cereghini, 1996). Aufgrund dieser vielen verschiedenen Expressionen verursachen HNF1B Mutationen im Menschen ein breites klinisches Spektrum. So sind HNF1B Mutationen mit MODY5 (**maturity onset diabetes of the young**) (Horikawa et al., 1997), Hypoplasie der Bauchspeicheldrüse (Haumaître et al., 2006), Fehlbildungen des Genitaltrakts (Lindner et al., 1999), Gicht (Bingham et al., 2003) und abnormen Leberfunktionen (Bellanne-Chantelot et al., 2004; Beckers et al., 2007) assoziiert.

1.6.3 Die Transkriptionsfaktoren *lhx1* und *pax8*

Neben *osr1*, *osr2* und *hnf1b* spielen die beiden Transkriptionsfaktoren *lhx1* (*lim1*) und *pax8* eine entscheidende Rolle in der Nierenentwicklung. *Lhx1* (**LIM homeobox 1**) ist ein LIM-Domänen enthaltender Homeoboxfaktor. Die LIM-Domänen-Transkriptionsfaktoren kontrollieren sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten die Expression von Genen, die bei der Strukturierung des Körpers und der Zellspezifizierung von Bedeutung sind (Curtiss and Heilig, 1998; Dawid et al., 1998). Das für die Nieren-

entwicklung in Vertebraten wichtige *lhx1* wurde von Taira et al. (1992) aus *Xenopus* Embryonen kloniert und ist in Vertebraten hoch konserviert (Dawid et al., 1998; Hobert and Westphal, 2000).

Pax8 (**Paired-Box-Protein 8**) stellt einen weiteren bedeutsamen Transkriptionsfaktor in der Nephrogenese dar und gehört zur Familie der Paired-Box Gene. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die eine Paired-Domäne und eine partielle oder vollständige Homeodomäne enthalten. Die Pax Gene wurden als erstes in *Drosophila* Segmentmutanten identifiziert. Orthologe Gene gibt es im gesamten Unterreich der vielzelligen Tiere. In Vertebraten sind neun Pax Gene bekannt, die in vier Subfamilien unterteilt werden können. Pax8 und Pax2 sind Mitglieder der Pax2/5/8 Familie (Balczarek et al., 1997) und für die Entwicklung der Niere in vielen Organismen essentiell.

Die Überexpression von *lhx1* oder *pax8* in *Xenopus* Embryonen hat nur einen geringen Effekt auf die Nierenentwicklung und führt bei ca. 30% der Fälle zu einer Vergrößerung der Pronephri. Eine Coexpression beider Faktoren dagegen verstärkt nicht nur diesen Effekt, sondern induziert zusätzlich ektopische Nierentubuli (Carroll and Vize, 1999; Wu et al., 2004). Carroll and Vize (1999) konnten diesen Synergismus nicht nur zwischen *lhx1* und *pax8*, sondern auch zwischen *lhx1* und *pax2* zeigen, was auf eine redundante Funktion von *pax2* und *pax8* in der Nierenentwicklung in *Xenopus* hinweist.

Die wichtige Rolle von *Lhx1* in der Nephrogenese konnte auch in der Maus gezeigt werden. Da *Lhx1* für die Differenzierung des intermediären Mesoderms notwendig ist (Tsang et al., 2000), führt die homozygote Deletion von *Lhx1* zum völligen Verlust der Niere (Shawlot and Behringer, 1995). Heterozygote Deletionen von *Lhx1* in Mäusen zeigen dagegen keinen Phänotyp. Des Weiteren ist *lhx1* essentiell für die Entwicklung des weiblichen Fortpflanzungsapparates (Kobayashi et al., 2004) und des anterioren Zentralnervensystems, da es die neurale Induktion (Taira et al., 1994b) und die Entwicklung des Vorder- und Mittelhirns (Shawlot and Behringer, 1995) beeinflusst. Im Menschen sind keine LHX1 Mutationen bekannt.

Interessanterweise entwickelt sich in Mäusen, die homozygot für Pax8 deletiert sind, die Niere völlig normal. Stattdessen fehlen in der Schilddrüse die Thyroxin produzierenden Follikelepithelzellen, und die Tiere sterben direkt nach der Geburt (Mansouri et al., 1998). Ebenso weisen Menschen mit einer Mutation im PAX8 Gen eine Schilddrüsenhypoplasie auf (Macchia et al., 1998). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass

Pax8 auch eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung von Säugern spielt. In Pax2 deletierten Mäusen ist die Bildung des Metanephros gehemmt, und es fehlt der gesamte Genitaltrakt (Torres et al., 1995). Ist in diesen Mäusen zusätzlich Pax8 inaktiviert, so wird der Nierenphänotyp verstärkt, da keine nephrogenen Zelllinien gebildet werden (Bouchard et al., 2002). Von Pax2 wird vermutet, dass es das funktionale Ortholog zum *Xenopus* pax8 ist, da beide Gene in verschiedenen Spezies die Funktion des anderen übernehmen (Heller and Brändli, 1999). So wird z.B. in Säugern Pax8 in der Schilddrüse und Pax2 in der Niere exprimiert, während in *Xenopus* Embryonen stattdessen pax2 in der Schilddrüse und pax8 in der Niere exprimiert wird. Im Menschen führen Mutationen im PAX2 Gen zu Geburtsdefekten mit Nierenfehlbildungen wie dem Renal-Kolobom-Syndrom, welches durch renale Hypoplasie und einer Spaltbildung im Auge charakterisiert ist (Eccles and Schimmenti, 1999).

In Tabelle 1 sind die einzelnen Einflüsse der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren auf die Nierenentwicklung in *Xenopus laevis* noch einmal zusammengefasst.

Tab. 1: Einfluss der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren auf die Nierenentwicklung in *Xenopus* Embryonen.

	Pronephros	ektopisches Nierengewebe
osr1	vergrößert	✓
osr2	vergrößert	✓
hnf1b	verkleinert	—
lhx1	vergrößert	—
pax8	vergrößert	—
lhx1+pax8	vergrößert	✓

1.7 Zielsetzung

Um den Signalweg zu analysieren, in dem die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* die Determination und Differenzierung der Niere regeln, sollten Explantate der animalen Region des Blastulastadiums von *Xenopus laevis*, die so genannten animalen Kappen, genutzt werden.

Als erstes sollte mittels quantitativer realtime-PCR untersucht werden, ob diese fünf Faktoren in animalen Kappen, die mit Aktivin A (10 ng/ml) und Retinsäure (10^{-4} M) zur Induktion der Pronephrosdifferenzierung behandelt wurden (Moriya et al., 1993), induziert werden. Zusätzlich sollten Mikroarrays zur Analyse induzierter animaler Kappen eingesetzt werden, um möglicherweise andere wichtige Gene zu identifizieren, die in den Signalweg der Pronephrosentwicklung involviert sind. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren allein durch Aktivin A oder Retinsäure in animalen Kappen induziert werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit war es Ziel, das Pronephrosdifferenzierungspotential der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen zu bestimmen. Hierzu sollten die jeweiligen Faktoren in Embryonen überexprimiert und in den animalen Kappen die Differenzierung in Pronephrosgewebe in der Abwesenheit von Aktivin A und Retinsäure analysiert werden. Um zwischen injizierter und endogener mRNA zu unterscheiden, sollten die humanen, funktional äquivalenten mRNAs eingesetzt werden, die nicht mit den *Xenopus* spezifischen Primern detektierbar sind.

Des Weiteren sollte mit Hilfe quantitativer realtime-PCR untersucht werden, welche Transkripte von wichtigen Genen der Nephrogenese durch HNF1B in animalen Kappen induziert werden. Mittels Luciferase-Reporterkonstrukten sollte anschließend getestet werden, ob einige dieser induzierten Gene über eine spezifische HNF1 Bindestelle im Promotor direkt durch HNF1B reguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht anders vermerkt ist, wurden nach den Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA und RNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe) und Roche (Mannheim).

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen (Hilden). Sequenzierungen wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Genetik, Institut für Zellbiologie, des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

2.3 Expressionsvektoren

Der pCSGFP2-Vektor wurde freundlicherweise von E. Amaya (Cambridge, UK) und das Maus-Osr2A-Plasmid (Kawai et al., 2005) von S. Kawai (Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt. pCSGFP2 exprimiert eine GFP-Variante, welche die Mutationen F64L und S65T enthält und im Vergleich zu Wildtyp GFP mit einer 35-mal stärkeren Signalintensität fluoresziert (Zernicka-Goetz et al., 1996).

Der Expressionsvektor myc-Rc/CMVHNF1b ist bei Wild et al. (2000) beschrieben.

Die myc-getaggten offenen Leserahmen der humanen Transkriptionsfaktoren LHX1 (RC210977) und PAX8 (RC200651) im pCMV6 Entry Vektor wurden über OriGene Technologies (USA) bezogen.

Der offene Leserahmen des humanen OSR1 (IRATp970D0444D6; RZPD) wurde in den Expressionsvektor pCS2+mt (Rupp et al., 1994) integriert und dabei mit einem N-terminalen myc-tag fusioniert. Hierzu wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'-GCTCTAGAGATGGGCAGCAAAACCTTGCC-3' (forward) und 5'-GCTCTAGATTAGCATTTGATCTTGGAGGTTTT-3' (reverse) XbaI-Schnittstellen (unterstrichen) an den offenen Leserahmen angefügt. Für die PCR wurde die Proof-reading Polymerase Pwo (Peqlab) eingesetzt, da ihre Fehlerrate deutlich geringer als bei anderen DNA-Polymerasen ist. Das Amplifikat wurde über die angefügten Schnittstellen in den Vektor pCS2+mt eingebracht und sequenziert.

Das pRL-Con Renilla-Luciferase Konstrukt enthält eine Renilla-Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (Pillai et al., 2005). Das HNF-4a P2-285 pGL3-Basic Reporterplasmid enthält den alternativen P2 Promotor des HNF-4a Genes bis Position -285 in Bezug auf den Translationsstart mit einer HNF1 Bindestelle (Thomas et al., 2001).

Die Ihx1-Luciferase-Reporterkonstrukte Ex-1:A, Ex-2:C, Ex-2:D und Ex-5:B wurden freundlicherweise von M.L. Rebbert (NICHD, USA) zur Verfügung gestellt.

Das Ihx1-Reporterkonstrukt Ex-2:C, welches die HNF1 Bindestelle in der Promotor-region enthält, wurde als Ausgangskonstrukt für die Minimalkonstrukte Ex1(-120/+3) und Ex1(-117/+3) genutzt. Mittels PCR, in der die Proof-reading Polymerase Pwo (Peqlab) verwendet wurde, wurden XhoI/HindIII DNA Fragmente, die die intakte oder teilweise zerstörte HNF1 Bindestelle enthalten, erzeugt und in den XhoI und HindIII verdauten pGL3-Basic Vektor (Promega, Mannheim) eingefügt. Folgende forward Primer wurden hierfür eingesetzt: 5'-CCGCTCGAGGCTTAATGGTT-3' (Ex1(-120/+3)) und 5'-CCGCTCGAGGGTTTACCAG-3' (Ex1(-117/+3)). Der reverse Primer 5'-CCCAAGCTTTCCCTTTGGTTAT-3' war für beide Konstrukte identisch. Die Restriktionsschnittstellen sind in den Primersequenzen unterstrichen.

Eine Überprüfung beider Konstrukte fand anschließend mittels Sequenzierung statt.

2.4 Funktions- und Expressionsanalysen der frühen nephro-genetischen Transkriptionsfaktoren in *Xenopus laevis*

2.4.1 *in vitro* Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Adulte Weibchen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden durch Injektion von 200-500 Einheiten humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) Pregnesin (Sigma Aldrich) in die dorsalen Lymphsäcke zur Eiablage gebracht. Etwa 12 Stunden nach der Injektion begann die Eiablage. Die Eier konnten durch leichte Massage oder sanften Druck des Hinterleibes gewonnen werden. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Vorganges ließen sich in zeitlich kurzen Abständen mehrere Eiablagen eines Weibchens erhalten. Die Eier wurden in einer Petrischale gesammelt und so verteilt, dass sie als Monolayer vorlagen. Für die *in vitro* Befruchtung der Eier wurde den männlichen Tieren der Hoden unter Betäubung mit 0,5% MS 222 entnommen. Die Qualität der Spermien konnte anhand ihrer Beweglichkeit unter dem Mikroskop bestimmt werden. Ohne den Hoden zu quetschen wurde ein Stück abgeschnitten und mit der Schnittfläche über die Eier gerieben. Die Hoden konnten auf einem in Holtfreter-Lösung getränkten Filterpapier bei 4°C etwa eine Woche lang aufbewahrt und für mehrere *in vitro* Befruchtungen verwendet werden. 5 min nach der Befruchtung wurden die Eier mit Wasser überschichtet. Eine erfolgreiche Befruchtung war nach ca. 20min erkennbar, wenn die kortikale Rotation, bei der sich der pigmentierte animale Pol nach oben dreht, einsetzte.

Die Gallerthülle wurde nach ca. 1,5 Stunden, wenn die Eier begannen sich zu teilen, durch eine 2- bis 4-minütige Inkubation in 2%igem Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH 8 entfernt. Anschließend wurden die enthüllten Embryonen mehrmals mit Wasser gewaschen und in Wasser bei 14–23°C kultiviert, bis das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht war. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

Holtfreter-Lösung: 60mM NaCl; 0,6mM KCl; 0,9mM CaCl₂; 0,2mM NaHCO₃

2.4.2 *In vitro* Synthese von mRNA

Die *in vitro* Synthese der mRNA wurde nach dem Protokoll von Nielsen und Shapiro (1986) durchgeführt. Es wurden jeweils 3µg linearisierter Vektor und 100 Einheiten RNA Polymerase verwendet. Die Konstrukte wurden für 1 Stunde bei 37°C mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (Tab. 2) linearisiert. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) gereinigt und mit der entsprechenden RNA-Polymerase (Tab. 2) transkribiert. Nach der RNA-Synthese und dem enzymatischen Abbau der DNA (Nielsen and Shapiro, 1986) wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe von Phase Lock Gel™ Heavy (1,5ml, Eppendorf) nach Herstellerangaben extrahiert. Jeder Ansatz wurde in vier Aliquots aufgeteilt und mit Natriumacetat gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und in 70% Ethanol bei –80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im Nanodrop-Photometer ermittelt und die Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Tab.2: Expressionsvektoren und die dazugehörigen Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen für die RNA Synthese

	Vektor	Restriktionsenzyme	RNA-Polymerase
GFP	pCS2+mt	PvuII	SP6
OSR1	pCS2+mt	NotI	SP6
Osr2A	pCMV-Tag2A	MluI	T3
HNF1B	myc-RC/CMV	SmaI	T7
LHX1	pCMV6 Entry	PinAI	T7
PAX8	pCMV6 Entry	PinAI	T7

2.4.3 mRNA Injektion

Vor der Injektion wurde die in Ethanol eingefrorene mRNA präzipitiert und in mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Aqua dest. aufgenommen. Zur Injektion wurden feine Nadeln aus Glasmikrokapillaren (Ø=0,58mm, World Precision Instruments, Sarasota) eingesetzt und die mRNA mittels der Injektionsapparatur Picospritze II (General Valve Corporation, Fairfield) im Zweizellstadium in einem Volumen von 10nl injiziert. Das Injektionsvolumen wurde durch Messen der Tropfengröße bestimmt.

Zur Analyse des Einflusses auf die Pronephrosentwicklung wurde 100pg oder 200pg mRNA, kodierend für OSR1 oder Osr2A, zusammen mit 100pg RNA des Green Fluorescence Proteins (GFP) als interne Kontrolle in eine Blastomere des Zweizellstadiums injiziert. Im Schwanzknospenstadium wurde die injizierte Seite anhand der grünen Fluoreszenz bestimmt. Im Falle der animalen Kappen von injizierten Embryonen wurde die mRNA zusammen mit GFP in die animale Region beider Blastomere injiziert.

Alle Injektionen wurden in einer 2%-Ficoll-Lösung durchgeführt, um ein Auslaufen der Eier an der Eintrittsstelle der Nadel zu verhindern. Nach 2 Stunden wurden die Embryonen in 0,1x MMR überführt.

1x MMR: 0,1M NaCl; 2mM KCl; 1mM MgSO₄; 2mM CaCl₂; 5mM HEPES (pH 7,8); 0,1mM EDTA

2.4.4 Präparation und Kultur von animalen Kappen

In der späten Blastula, Stadium 9 (Nieuwkoop and Faber, 1975), wurden die animalen Kappen mit einem Durchmesser von ca. 0,3mm geschnitten. Dazu wurde der Gastromaster (Xenotek Engineering, Belleville, USA) eingesetzt, der ein einfaches Schneiden der animalen Kappen mit Hilfe 20µm dünner Platinschlaufen ermöglicht, die für wenige Mikrosekunden auf 450°C erhitzt wurden. Die Explantate wurden anschließend für 3 Stunden in Induktionslösung kultiviert. Diese Lösung enthielt 10ng/ml rekombinantes humanes Aktivin A (Sigma, A4941) und 10⁻⁴M all-trans Retinsäure (Sigma, R2625) in Steinberg Lösung mit 0,1% BSA (bovine serum albumin, Fraktion 5). Im Falle von Kontrollen oder Explantaten von mRNA injizierten Embryonen wurden die animalen Kappen nur in Steinberg Lösung mit 0,1% BSA inkubiert. Nach 3 Stunden wurden die animalen Kappen dreimal mit Steinberg Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Explantate bei 20°C in Steinberg Lösung kultiviert, bis sie ein Stadium äquivalent zum embryonalen Stadium 40-42 (nach 4 Tagen) erreicht hatten, und konnten anschließend für die Whole-mount Immunofärbung eingesetzt werden.

Steinberg Lösung: 58mM NaCl; 0,67mM KCl; 0,34mM Ca(NO₃)₂; 0,83mM MgSO₄; 3mM HEPES (pH 7,8)

2.4.5 Immunfluoreszenz der Pronephri in *Xenopus laevis* Larven und animalen Kappen

Die für vier Tage inkubierten animalen Kappen oder die injizierten Larven im Stadium 45 wurden in MEMFA fixiert, in Methanol dehydriert und bei -20°C aufbewahrt. Für die Immunfluoreszenz wurden die animalen Kappen oder Larven mit PBS rehydriert und anschließend mit PBT/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wurde mit dem Gemisch der beiden Erstantikörper, 3G8 (1:40 verdünnt) und 4A6 (1:4 verdünnt), in PBT/10% Ziegen Serum über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei beiden Erstantikörpern handelt es sich um monoklonale Mausantikörper. 3G8 ist gegen die terminalen Differenzierungsmarker der Pronephroskanälchen (Tubuli) und der Nephrostome und 4A6 gegen die terminalen Differenzierungsmarker des Pronephrosganges (Ductus) und der Nephrostome gerichtet (Vize et al., 1995). Nach fünfmaligem Waschen für je 1,5 Stunden in PBT bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 in PBT/10% Ziegen Serum verdünnten Cy3 gekoppelten Ratte-Anti-Maus Zweitantikörper (Codennr. 415-166-166, Jackson ImmunoResearch) bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBT bei Raumtemperatur konnte am Auflicht-Fluoreszenzstereomikroskop (Leica, Köln) ausgewertet werden.

Von den immunfluoreszierenden Larven wurde in der lateralen Ansicht eine Größenbestimmung des Pronephroskanals und des proximalen Abschnittes des Pronephrosganges durchgeführt. Diese Strukturen wurden mithilfe des Computerprogramms AxioVision 4.6 von Zeiss vermessen und der Größenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite berechnet. Kein Größenunterschied wurde gleich 100% gesetzt.

MEMFA: 0,1M MOPS; 2mM EGTA; 1mM MgSO_4 ; 3,7% Formaldehyd

PBS: 137mM NaCl; 2,6mM KCl; 10mM Na_2HPO_4 ; 1,5mM KH_2PO_4 (pH 7,2 bis 7,4)

PBT: PBS; 2mg/ml BSA (bovine serum albumin, Fraktion 5); 0,1% Triton X-100

Erstantikörper: Die Antikörper 3G8 und 4A6 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. E. A. Jones (Warwick University, Coventry, England) zur Verfügung gestellt.

2.4.6 RNA Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA von 30 animalen Kappen wurde mittels peqGOLD RNAPure (PeqLab) nach Angaben des Herstellers isoliert, anschließend in 5µl DEPC-Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Aus 30 animalen Kappen ließen sich 1-5µg RNA isolieren. Die RNA-Proben wurden bei –80 °C gelagert.

Die cDNA-Synthese aus 1µg RNA erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wird die isolierte RNA einer reversen Transkription mit Random Hexameren unterzogen.

2.4.7 Quantitative realtime-PCR

Zur Quantifizierung von spezifischen mRNAs wurde eine reverse Transkription (RT) mit nachgeschalteter quantitativer realtime-PCR (Echtzeit-PCR) durchgeführt.

Bei der realtime-PCR erfolgt die DNA-Quantifizierung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und nach Anregung durch eine Halogenlampe fluoresziert. Die emittierte Fluoreszenz ist linear zur Konzentration der gebildeten DNA-Moleküle. Als Parameter für die Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge wird in der exponentiellen Phase der PCR der C_T-Wert (threshold cycle) berechnet, der die Zykluszahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

Zur DNA-Quantifizierung wurde hier der Power-SYBRGreen Mix (Applied Biosystems) verwendet. Die eingesetzten genspezifischen Primer (Tab. 3) mit einer Schmelztemperatur zwischen 59°C und 61°C wurden mit der Software Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) entwickelt. Die Amplifikation und Detektion von cDNA wurde mit dem 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) und der zugehörigen Software nach folgenden Bedingungen durchgeführt: Das Reaktionsvolumen betrug 20µl. Die Primer lagen in einer Konzentration von 0,3µM vor, und 50ng cDNA wurden eingesetzt. Nach einer Inkubation von 2min bei 50°C und dann 10min bei 95°C (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase) folgten 40 Zyklen mit 15s bei 95°C (Denaturierung) und 60s bei 60°C (Annealing-Extension).

Tab. 3: Liste der in der quantitativen realtime-PCR eingesetzten Primer, die eine Amplikonlänge von 90 bis 124 bp erzeugen. for: forward; rev: reverse

Gensymbol	Sequenz (5' → 3')	
anxa13	for	CCAAAGGCAAGAAGTGAAGC
	rev	CTAATGCCGCCTTCTCAAAG
c8a	for	CTGCAGGATTTGATGGTCCT
	rev	TCTCTTTCCAGCTTGGCATT
cer1	for	ACCTTGCCCTTCACTCAGAA
	rev	TTGCTGATTTGGAACATGGA
chrd	for	GCTGTGGAGGAGAGTCGTT
	rev	GCTGCAGGTTGAATCTAGCC
cpn1	for	GAAGAAGTGTGCAGGGAAGG
	rev	ACCGTGCATATTCCCAACAT
esd	for	ATCAAGCTGCCTCAGAGCAT
	rev	ACCAAAATCCCAGCTCTCCT
fgfr4a	for	AGTGAATGGAAGCCGATTG
	rev	TCCGTAGGTGAAGCACCTCT
fgfr4c	for	AGACTCTGCAAACGCCAACT
	rev	TATGCGAATCAGTGGAGCAC
gdnf	for	TAAAGACCGAAAGCGGAAAA
	rev	TCAGTTCCTCCTTGGTTTCG
gjb1	for	GGGTCTGCATCGTTCTGAAT
	rev	TTGATGCTCTTTGCTGATGC
gsc	for	CAGCAATGCTCGTGTGTACC
	rev	CAAAGTGCCAACGTTTCATGT
hnf1a	for	ACAGAAGAATCCCAGCAAGG
	rev	CTGAGCCTGTGATGGTGAGA
hnf1b	for	CAGTCCAGGGTTCTGGAAAT
	rev	CTGTCCTGGGACTGGATTTT
hnf4a	for	TATCCCGGCTTTCTGTGAAC
	rev	CTTTGTAGCCCCAAGAAGCA
lhx1	for	GTGCAACCTGACCGAGAAAT
	rev	GACTAGGTCACTGGGGGAGA
ncor1	for	AGCACAGCATGAAGGTGTTG
	rev	CCAATGGAACCTTGGTTGCT
odc	for	TGGGCTGGATCGTATCGTAGA
	rev	CATTGAATGTCGAGGCTGCA
osr1	for	ACCCTTCAAATGCCAGGAG
	rev	TTTGATTTTGGGAAGGCTTGAG
osr2	for	TGCAGCTCACCAACTACTCC
	rev	ATGGTCTGTACAGCGCTCAG
osr2A	for	CATTCCAAAGAGAAACCATTCA
	rev	GGCATTGTGGGGTGATT
osr2B	for	CATTCCAAAGAGAAACCATTCA
	rev	TGTAGGGCTTGATGTCTGC
otx2	for	TTTGCCAAAACCTCGTTACCC
	rev	CACCTTGCTCTGCGGTTTTT

Gensymbol	Sequenz (5' → 3')	
pax2a	for	GTGCTGCTCATGTCTTTCCA
	rev	TGGGTGGCTGTAAGGATTTC
pax8	for	TGGGATCCACGTATTCCATC
	rev	GCAGCTCTCCTGGTCACTGT
pcdh8.2	for	CTCGGGTGAAGTTCTGCTTC
	rev	GGAGTTTTTGCCCTTCATCTG
prodh2	for	CAGTGCCCATTTGAGGAAGAT
	rev	CGAGAGATCCACACAGTCCA
rbms1	for	AAGAGCCTGGCCTAGAGAGG
	rev	TGGGGTAAAACCCATTTTGA
rpl35a	for	TTGGAAAAAGATGTGCCTACG
	rev	CACCTTTCCCCAGATCACAC
slc22a6	for	TCTTGGTGGGACTAGCGTTC
	rev	TTCTGGGATCCACCATGAAT
slc4a7	for	TTGCGATATGTGCCTCTCTG
	rev	GGAACACAACAGCAGCTGAA
slc5a2	for	AGGCAGTGGGCATTTTGTAG
	rev	ACCAGGACCACAAACAAAGC
slc7a8	for	GAACCAGACATTGGCCTCAT
	rev	AGGCAATATTGGCAAAAACG
tfe3	for	CTAATGCTGCGCATACAGGA
	rev	GCGGTAGGCTCACTCTTCAG
tnfrsf25	for	GGTTTGTCTGTCACGTCTCCT
	rev	CGCTGTTAATCCGGTTTCTT
trps1	for	GCTATGTCTGCAATGCGTGT
	rev	TCTGCTCACCATTGTTCTGC
ube3a	for	TCTGGTGCAAGGACAACAAC
	rev	TTCCATGGCAATCATCTCAA
wnt9b	for	TCGATTCCTGCAGAACTTCC
	rev	GATTTAATGCCTGCGTTGCT
wnt11	for	TAACCTTTCTGCTGCACACG
	rev	CAGTGCTGGGTCTGATTCAA
wnt11b	for	TCCCCTGACTACTGCACAAA
	rev	GGTTGCAGCTGTCACTACCA

Eine Überprüfung auf unspezifische Produkte (z.B. Primer-Dimere) erfolgte nach abgeschlossener PCR mittels einer Schmelzpunktanalyse im Thermocycler. Dies ermöglichte die Differenzierung zwischen kurzen, bei niedriger Temperatur schmelzenden Primer-Dimeren und den längeren spezifischen PCR-Produkten.

In allen Versuchen konnte keine Bildung von Primer-Dimeren festgestellt werden, und die Wasser- und Negativ (Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase)-Kontrollen bildeten keine spezifischen Produkte.

Von jeder cDNA wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. In allen durchgeführten quantitativen realtime-PCRs wurden die C_T -Werte der jeweiligen Gene zum C_T -Wert des nicht-regulierten Referenzgens (housekeeping gene) **odc** (**O**rnithin-**D**ecarboxylase) normalisiert. Die Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, die den C_T -Wert der nicht induzierten und den der induzierten animalen Kappen vergleicht. Hierbei wurde von jeder Doppelbestimmung der Mittelwert gebildet und die Differenz der Mittelwerte von Gen und Referenzgen (ΔC_T) errechnet. Die ΔC_T -Werte der behandelten wurden von den ΔC_T -Werten der unbehandelten animalen Kappen subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert). Dann wurden die relativen Quantitäten der mRNAs bestimmt, indem die $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) wurden, so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zu den unbehandelten animalen Kappen entsprechen.

2.4.8 Nachweis der überexprimierten Proteine mittels Western Blot

Überreste von 10 injizierten Embryonen, von denen vorher die animalen Kappen geschnitten wurden, wurden im Lysepuffer zermörsert und unlösliche Bestandteile bei 15000rpm 15min bei 4°C (Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge) sedimentiert. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde mit dem BioRad Protein-Assay System bestimmt. 15µg Protein in Lysepuffer wurden mit 5x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt, 4min bei 95°C erhitzt und in einem 10% SD S-Polyacrylamidgel (Mini-Protean II-Gele, BioRad) aufgetrennt. Durch Elektrottransfer (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer-Cell, BioRad) wurden die Proteine bei 1,5mA/cm² Gel für 1 Stunde in Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell Biosciences, Dassel) übertragen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 0,5% Blockingreagenz (Liquid block, RPN 3601, Amersham, Braunschweig) in Blockingpuffer geblockt. Zum Nachweis der myc-getaggen Proteine folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper 9E10 (Evan et al., 1985), der 1:5 in PBS/0,1% Tween20 verdünnt wurde. Anschließend wurde 3 x 10min mit PBS/0,1% Tween20 gewaschen und mit dem 1:5000 in PBS/0,1% Tween20 verdünnten Zweitantikörper (Peroxidase-gekoppelter Ratte-Anti-Maus-Antikörper IgG, Dianova) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit dem Enhanced Chemoluminescence-System (ECL-System, Amersham) entsprechend den Herstellerangaben.

Lysepuffer: 50mM Tris (pH 7,9), 25% (v/v) Glycerol, 50mM KCl, 2mM DTT, 0,1mM EDTA, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)

Transferpuffer: 48mM Tris; 39mM Glycin; 0,04% SDS; 20% Methanol

Blockingpuffer: 150mM NaCl; 100mM Tris (pH 7,4)

2.5 Identifikation einer HNF1 Bindestelle im Ihx1 Gen

2.5.1 Zellkultur und Luciferase-Assay

Die Zellkulturversuche wurden von Sabine Senkel (Institut für Zellbiologie, Tumorforschung, Uniklinikum Essen) durchgeführt.

2.5.1.1 Zellkultur von HEK293 (HNF1B) Zellen

Die HEK293 (HNF1B) Zellen (immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen), welche ein Tetracyclin-induzierbares HNF1B Transgen enthalten (Senkel et al., 2005), wurden bei 37°C, 7,2% CO₂ und 95% wassergesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (Biochrom), 2mM L-Glutamin sowie je 100U/ml Penicillin und Streptomycin sowie 100µg/ml Zeocin (Cayla) und 15µg/ml Blastidin (Cayla) kultiviert. Die Lagerung der Zelllinien erfolgte im flüssigen Stickstoff. Dazu wurden 10⁷ Zellen in 1ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen, in 1ml Aliquots langsam auf -70°C abgekühlt und dann im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Die Aliquots wurden zum Auftauen langsam auf 37°C erwärmt und in 10ml vorgewärmtem Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen. Dann wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in 10cm-Schalen ausgesät.

2.5.1.2 Transiente Transfektion und Luciferase-Assay

Als Luciferase-Reporterkonstrukte wurden die in Kapitel 2.3 beschriebenen Konstrukte eingesetzt. Dabei dient das pRL-Con Renilla-Luciferase Konstrukt als interner Standard zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und das HNF-4a P2-285 Reporterplasmid als Positivkontrolle in den durchgeführten Luciferase-Assays.

In einer 96well-Platte (17.500 Zellen/well) wurden 30ng des jeweiligen Firefly-Luciferase-Reporterkonstruktes zusammen mit 0,05ng pRL-Con mittels FuGeneHD (Roche) transfiziert. 4 Stunden nach der Transfektion wurde die HNF1B Expression durch Gabe von 1µg/ml Doxycyclin induziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, 25µl passiver Lysepuffer (Promega) in jedes well gegeben und anschließend die 96well-Platte für 15min bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Die Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität wurde in 5µl des Lysats als Dreifachbestimmung mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay“ (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Luminometer (CentroXS³ LB960, Berthold) gemessen.

2.5.2 Luciferase-Assay in animalen Kappen

Insgesamt 50pg lhx1-Reporterkonstrukt zusammen mit 0,75pg pRL-Con als interne Kontrolle wurden allein oder zusammen mit 150pg HNF1B mRNA in die animale Region beider Blastomere des Zweizellstadiums injiziert. Die animalen Kappen wurden in der späten Blastula (Nieuwkoop and Faber, 1975) geschnitten und für 4 Stunden in Steinberg Lösung kultiviert. 4 animale Kappen wurden in 50µl Lysepuffer (Promega) lysiert und für 15min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität in 10µl des Lysats mit Hilfe des „Dual-Luciferase Reporter Assay“ (Promega) nach Angaben des Herstellers in einem Luminometer (CentroXS³ LB960, Berthold) gemessen.

2.6 Mikroarrayanalyse

Die DNA-Mikroarrayanalyse fand in Kooperation mit PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß (Biochiplabor, Uniklinikum Essen) statt.

Für die Mikroarrayanalyse wurden die GeneChip® *Xenopus laevis* Genome Arrays von Affymetrix eingesetzt. Diese Mikroarrays enthalten 14.400 Sondensätze (probesets) mit 16 Oligonukleotidpaaren gegen *Xenopus laevis* Transkripte und wurden in Zusammenarbeit mit repräsentativen Mitgliedern der *Xenopus* Community und des National Institutes of Health entwickelt. Bei dem GeneChip® *Xenopus laevis* Genome Array handelt es sich um einen high-density Oligonukleotid-Mikroarray.

Hierbei werden die Sonden direkt an der Glasoberfläche (Glas-Wafer, Festphase) durch eine kombinierte Methode aus Nukleotidsynthese und Photolithographie synthetisiert. Ein Sondensatz (probeset) besteht aus 16 verschiedenen Oligonukleotid-Probenpaaren, die wiederum aus einer „Perfect Match“ (PM)- und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle bestehen. Jede Probenzelle (24×24µm) enthält ca. 10^7 Kopien einer DNA-Oligonukleotid-Probe (25mer). Das „Perfect Match“ (PM)-Oligonukleotid ist 100%ig komplementär zu der Sequenz des Gens, das durch den Sondensatz repräsentiert wird. Das „Mismatch“ (MM)-Oligonukleotid enthält eine Punktmutation in der Mitte der Sequenz, was die Bindung des entsprechenden Transkripts beeinträchtigt. Dies ermöglicht die Bestimmung des Hintergrunds und der nicht spezifischen Hybridisierung sowie die Korrektur der für die „Perfect Match“-Oligonukleotide gemessenen Signale. Bei der Auswertung der Hybridisierungsdaten mittels der „GeneChip Operating Software“ (GCOS, Affymetrix) wird für ein Probenpaar die Intensität der MM-Probe von der der PM-Probe subtrahiert.

2.6.1 RNA Isolierung für Mikroarray

Die RNA aus 30 animalen Kappen wurde mittels peqGOLD RNAPure (PeqLab) mit anschließendem DNase-Verdau nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in 5µl DEPC-Wasser aufgenommen, ihre Konzentration photometrisch bestimmt und dann durch Verdünnung auf 1µg/µl eingestellt. Die RNA-Proben wurden bis zur Mikroarrayanalyse bei –80 °C eingefroren.

2.6.2 cDNA-Synthese, Markierung und Hybridisierung

1µg mRNA wurde mit Hilfe eines T7-d(T)21-Primers und des Enzyms Reverse Transkriptase zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Danach wurde der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I, DNA-Ligase und RNaseH synthetisiert. Die Einführung der T7-Promotorsequenz erlaubt in einer *in vitro* Transkriptionsreaktion mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die partiell komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen PM-Oligonukleotiden ist. Da jedes cDNA-Molekül viele Male abgeschrieben wird (lineare Amplifizierung), erhält man erst durch diesen Schritt genügend Material für eine Mikroarray-Hybridisierung (ca. 10µg cRNA). Die biotinmarkierten cRNAs (Target) wurden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert.

Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNA wurden die gebundenen komplementären cRNAs durch Bindung an Streptavidin gekoppeltes Phycoerythrin gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde dann durch Aktivierung mit Laserlicht im Affymetrix GeneChip Scanner (GCS) 3000 7G gemessen und quantifiziert. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual durchgeführt.

2.6.3 Auswertung der Daten

Mit Hilfe der GCOS Software wurden die Hybridisierungsdaten analysiert und so die Signalintensitäten („Average Differences“) und die so genannten „Absolute calls“ bestimmt. Die „Absolute calls“ definieren ein Transkript als vorhanden (P für „Present“), nicht vorhanden (A für „Absent“) oder im Grenzbereich liegend (M für „Marginal“). Dabei erfolgte eine Normierung der Intensitäten (globale Skalierung) jedes Mikroarrays auf eine Ziel-Intensität von 1000 Einheiten, damit Unterschiede in der Menge und der Qualität der cRNA-Proben und andere Variablen kompensiert wurden. Um differenziell exprimierte Gene zu ermitteln, wurden die Daten zweier Hybridisierungen verglichen. In der „comparison analysis“ wurden die behandelten (1,5 Stunden Inkubation in 10mg/ml Aktivin A und 10^{-4} M Retinsäure) mit den unbehandelten animalen Kappen (Kontrolle) verglichen. Der Array mit den Kontrollen wurde als Basislinie definiert, der Array mit den behandelten animalen Kappen als experimenteller Array (Experiment). Die Werte jeder Probe auf dem Kontroll-Array wurden mit den entsprechenden Werten des experimentellen Arrays verglichen. Die Datei des Vergleichs wurde weiterhin mit der Affymetrix Data Mining Tool 3.0 Software gefiltert.

Um differentiell exprimierte Proben (Sondensätze) zu identifizieren, wurden folgende Filterbedingungen eingesetzt:

- Die Proben mussten induziert (I) oder reprimiert (D) sein.
- Die Proben sollten in den behandelten animalen Kappen mindestens eine 1,5-fache Änderung gegenüber den entsprechenden Proben in den unbehandelten animalen Kappen aufweisen (fold change $\geq 1,5$ für induzierte oder fold change $\leq -1,5$ für reprimierte Proben).
- Im Array sollte der „change p-value“ bei $p < 0,002$ in den induzierten Proben und bei $p > 0,998$ in den reprimierten Proben liegen.

- Und weiterhin sollte mindestens in den Kontrollen oder in den induzierten animalen Kappen das Transkript als vorhanden (present call) definiert worden sein.

2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der gemessenen Pronephrosgrößen in immunfluoreszierenden Larven wurde der t-Test eingesetzt, da von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden kann (Dudziak et al., 2008).

Zur Auswertung der quantitativen realtime-PCR konnte kein statistischer Test angewandt werden, da aufgrund der geringen Stichprobe (N=4 bzw. 5) nicht eindeutig war, ob die Werte normalverteilt waren. Daher wurde eine Expression bzw. Repression angenommen, wenn alle relativen Quantitäten einer mRNA im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen größer bzw. kleiner als 1 waren.

Bei der Bewertung der Luciferaseaktivitäten in der Zellkultur wurde ebenfalls aufgrund einer Normalverteilung der Daten der t-Test zur Signifikanzfeststellung genutzt. Dagegen musste die signifikante Änderung der Luciferaseaktivität in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests überprüft werden, da es sich hier um unabhängige, nicht-normalverteilte Stichproben handelte.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des animalen Kappen-Tests zur Analyse der Pronephrosentwicklung

Die Induktion von animalen Kappen mit 10ng/ml Aktivin A und 10^{-4} M Retinsäure für drei Stunden führt zur Pronephrosdifferenzierung (Moriya et al., 1993).

Zur Untersuchung der Effizienz der Pronephrosdifferenzierung in solchen induzierten Explantaten wurden animale Kappen in der späten Blastula (Stadium 9; Nieuwkoop and Faber, 1975) geschnitten, für drei Stunden mit Aktivin A und Retinsäure behandelt und anschließend für vier Tage in Steinberg Lösung inkubiert (s. Schema in Abb. 4A). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte animale Kappen, die ausschließlich für vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert wurden. Nach vier Tagen wurden die Explantate fixiert und das induzierte pronephrische Gewebe durch Immunhistofärbung sichtbar gemacht. Abbildung 4B zeigt exemplarisch eine behandelte und eine unbehandelte animale Kappe. Während animale Kappen ohne Induktionsfaktoren zu atypischer Epidermis differenzieren, zeigen mit Aktivin A und Retinsäure behandelte animale Kappen sowohl im Auflicht als auch mit Fluoreszenzfilter (DsRed: rote Fluoreszenz) deutlich pronephrische Tubuli-Strukturen.

Da das Ausmaß der Differenzierung zwischen den einzelnen induzierten animalen Kappen variiert, wurden die immunhistochemisch gefärbten Explantate in drei verschiedene Kategorien eingeteilt, die in Abbildung 5A dargestellt sind. Abbildung 5B zeigt das Differenzierungspotential von insgesamt 219 unbehandelten bzw. 403 behandelten animalen Kappen. 85% der unbehandelten Kappen zeigten keine Differenzierung, während in 52% der Aktivin A und RA induzierten Explantate eine Pronephrosentwicklung detektierbar war (Abb. 5B). Eine hundertprozentige Differenzierung in behandelten animalen Kappen wurde in keinem der Versuche erreicht. In wenigen Experimenten ließen sich die animalen Kappen gar nicht induzieren.

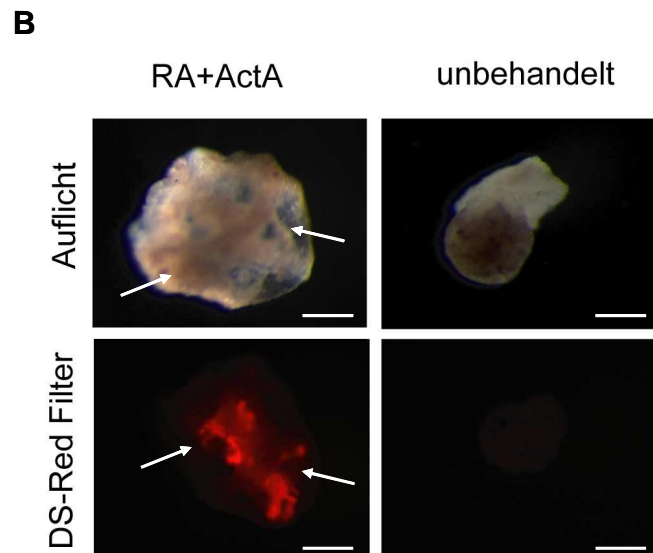
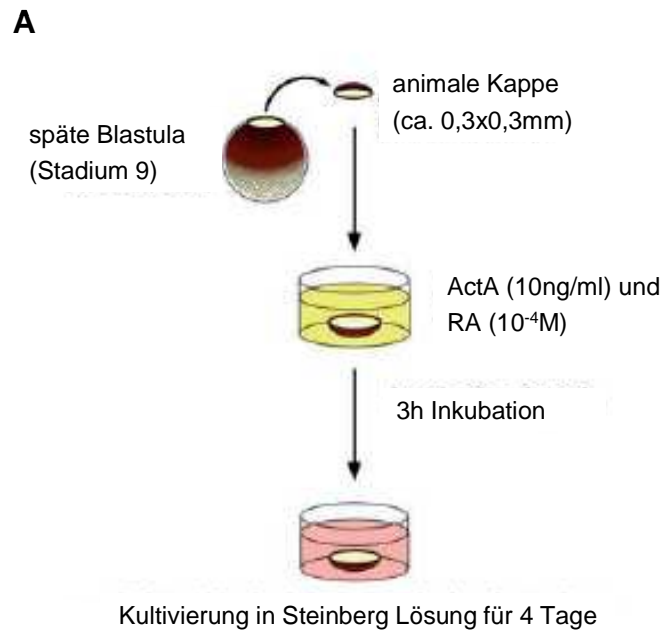


Abb. 4: Die gemeinsame Behandlung mit Aktivin A und Retinsäure induziert Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen. (A) zeigt die schematische Darstellung der Isolation und Kultivierung animaler Kappen (modifiziert nach Chan and Asashima, 2006). Die animalen Kappen wurden für drei Stunden in 10ng/ml Aktivin A (ActA) und 10⁻⁴M Retinsäure (RA) und anschließend bzw. im Falle der unbehandelten animalen Kappen ausschließlich für vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert. Danach wurden die Pronephrosstrukturen immunohistochemisch mit Hilfe monoklonaler Antikörper für die Tubuli (3G8) und den Ductus (4A6) (Vize et al., 1995) sichtbar gemacht. Tubuli-Strukturen in der behandelten animalen Kappe sind durch Pfeile markiert (Auflicht und rote Fluoreszenz). Die unbehandelte animale Kappe zeigt keine Pronephrosdifferenzierung. Der Balken entspricht 200µm.

Aufgrund der Varianz in der Induzierbarkeit animaler Kappen wurden in allen Versuchen als Negativkontrolle unbehandelte und als Positivkontrolle Aktivin A und Retinsäure behandelte animale Kappen eingesetzt. Nur wenn sich in den behandelten animalen Kappen nach vier Tagen Pronephrosgewebe entwickelte und die Kontrollen keine eindeutige Differenzierung zeigten, wurden die Daten in die Auswertung übernommen.

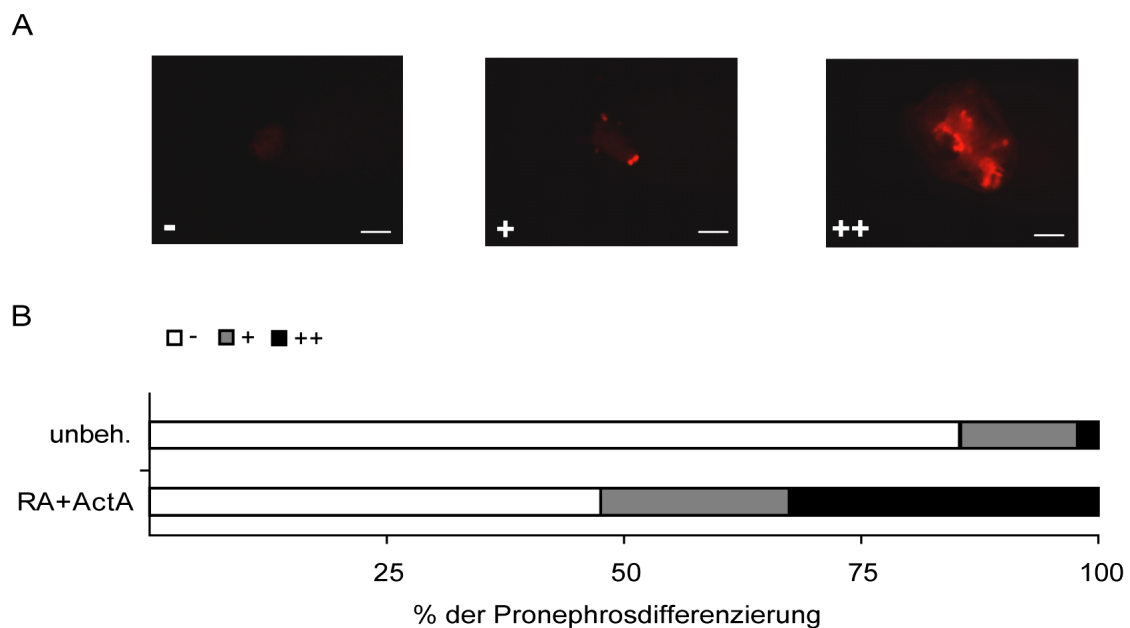


Abb. 5: Pronephrosdifferenzierungspotential unbehandelter und mit Aktivin A und Retinsäure induzierter animaler Kappen. Animale Kappen wurden für drei Stunden mit Aktivin A (ActA) und Retinsäure (RA) behandelt und anschließend für vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert. Unbehandelte (unbeh.) animale Kappen wurden ausschließlich in Steinberg Lösung kultiviert. Anschließend wurden die animalen Kappen fixiert und die Pronephrosstrukturen mittels Immunhistofärbung sichtbar gemacht. (A) Zur Analyse der Pronephrosdifferenzierung in den angefärbten animalen Kappen wurde folgende Klassifizierung eingesetzt: - keine Pronephrosentwicklung, + zwei oder mehrere kleine Stellen bestehend aus Pronephroszellen, ++ tubuli-ähnliche Strukturen. Der Balken entspricht 200 μm. (B) Die Auswertung der Pronephrosdifferenzierung in 403 behandelten und 219 unbehandelten animalen Kappen erfolgte unter Verwendung der in (A) beschriebenen Klassifizierung.

3.2 Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen

3.2.1 Zeitabhängige Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* in Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen wurden induzierte animale Kappen in einem Zeitintervall von 13 Stunden mittels quantitativer realtime-PCR auf die mRNA-Expression analysiert. Für die Zeitpunkte 1,5 und drei Stunden wurden animale Kappen untersucht, die ausschließlich mit 10ng/ml Aktivin A und 10^{-4} M Retinsäure inkubiert worden waren. Die Analyse der Zeitpunkte fünf, sieben und 13 Stunden enthielt animale Kappen, die für drei Stunden mit Aktivin A und Retinsäure behandelt und anschließend für die restliche Zeit in Steinberg Lösung kultiviert wurden. Zur Feststellung einer Änderung des Expressionsmusters in behandelten animalen Kappen wurden für jeden Zeitpunkt ebenfalls unbehandelte animale Kappen analysiert und anschließend die mRNA-Expressionen verglichen. Da nur vier unabhängige Gruppen von 30 animalen Kappen pro Zeitpunkt untersucht wurden und so nicht eindeutig gesagt werden kann, ob eine Normalverteilung der Werte vorliegt oder nicht, konnte kein statistischer Test angewendet werden. Daher wurden Gene als induziert oder reprimiert definiert, wenn für alle vier Messungen der Wert größer bzw. kleiner als eins war. Unter Anwendung dieser Kriterien wurden alle fünf Transkripte induziert, wiesen aber unterschiedliche Kinetiken auf (Abb. 6). So wurden *osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1* mRNAs innerhalb von 1,5 Stunden induziert, während erst nach 13 Stunden ein klarer Anstieg in der Induktion von *pax8* im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen festgestellt wurde. Für *osr1* und *osr2* zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Expression mit einer nochmals deutlich erhöhten Induktion nach 13 Stunden verglichen mit den früheren Zeitpunkten. Dagegen schienen *hnf1b* und *lhx1* die höchste mRNA-Expression nach sieben Stunden erreicht zu haben. Aber auch nach 13 Stunden war hier die Expression im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen immer noch deutlich erhöht.

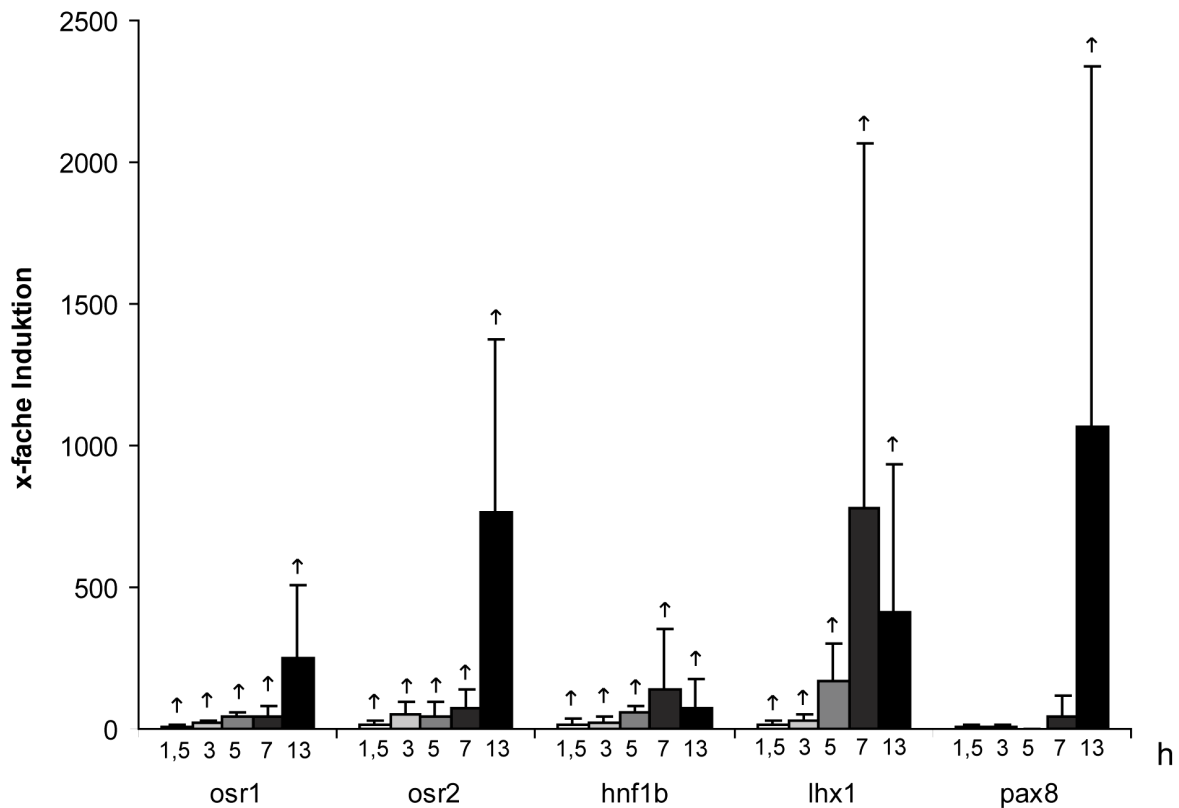


Abb. 6: osr1, osr2, hnf1b und lhx1 werden nach 1,5 Stunden und pax8 nach 13 Stunden in mit Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen induziert. Animale Kappen wurden in der späten Blastula (Stadium 9; Nieuwkoop und Faber, 1975) geschnitten und für 1,5 bzw. drei Stunden in Aktivin A (10ng/ml) und Retinsäure (10^{-4} M) inkubiert. Für die Zeitpunkte fünf, sieben und 13 Stunden wurden sie nach drei Stunden Induktion für die restliche Zeit in Steinberg Lösung kultiviert (Moriya et al., 1993). Danach wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt. Die Standardabweichungen von vier unabhängigen Gruppen von animalen Kappen sind angegeben. Eine eindeutige Induktion in allen vier getesteten unabhängigen Gruppen von animalen Kappen ist durch einen nach oben weisenden Pfeil angezeigt (Faktor > 1). In einigen Experimenten wurden verschiedene Primer eingesetzt, um osr2 zu detektieren. In jeweils zwei der analysierten Gruppen von animalen Kappen der Zeitpunkte drei, fünf und sieben Stunden und in dreien nach 13 Stunden wurden spezifische Primer eingesetzt, die die in *Xenopus laevis* dominant exprimierte Splicevariante osr2B amplifizieren (s. 3.2.2). In allen anderen Experimenten wurden Primer verwendet, die beide osr2 Splicevarianten detektieren.

3.2.2 Identifizierung von osr2 Splicevarianten in *Xenopus*

Für das Maus Osr2 sind zwei Splicevarianten beschrieben, die durch alternatives Splicen in Exon 4 entstehen (Kawai et al., 2005). Die lange Version wird Osr2A genannt und kodiert ein Protein mit 312 Aminosäuren (AS) und fünf Zinkfinger-

domänen, während die kurze Version Osr2B ein Protein mit 276 AS und nur drei Zinkfingerdomänen kodiert. Beide Varianten zeigen gegensätzliche transkriptionale Aktivität, woraus sich schließen lässt, dass die Funktion von Osr2 in verschiedenen Zellen durch alternatives Splicen reguliert wird (Kawai et al., 2005).

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse stellte sich die Frage, ob es auch verschiedene *osr2* Splicevarianten in *Xenopus* gibt. Die Datenbanksuche nach *Xenopus* cDNAs für die korrespondierenden Splicevarianten ergab zwei Transkripte; es wurde eine cDNA kodierend für *osr2B* gefunden (Accession No.: BC108579), aber keine für *osr2A*. Dagegen fand sich in *Xenopus tropicalis* eine cDNA Sequenz kodierend für *osr2A* (Accession No.: CU075721). Vergleichbar mit der Maus enthält *osr2A* fünf Zinkfinger (312 AS) und *osr2B* drei Zinkfinger (271 AS) (Abb. 7A). Ebenfalls entstehen diese beiden Transkripte wie bei der Maus durch alternatives Splicen in Exon 4. Wie das Alignment in Abbildung 7B zeigt, ist die Nukleotidsequenz um die alternativen Splicepositionen in Exon 4 zwischen beiden Spezies identisch.

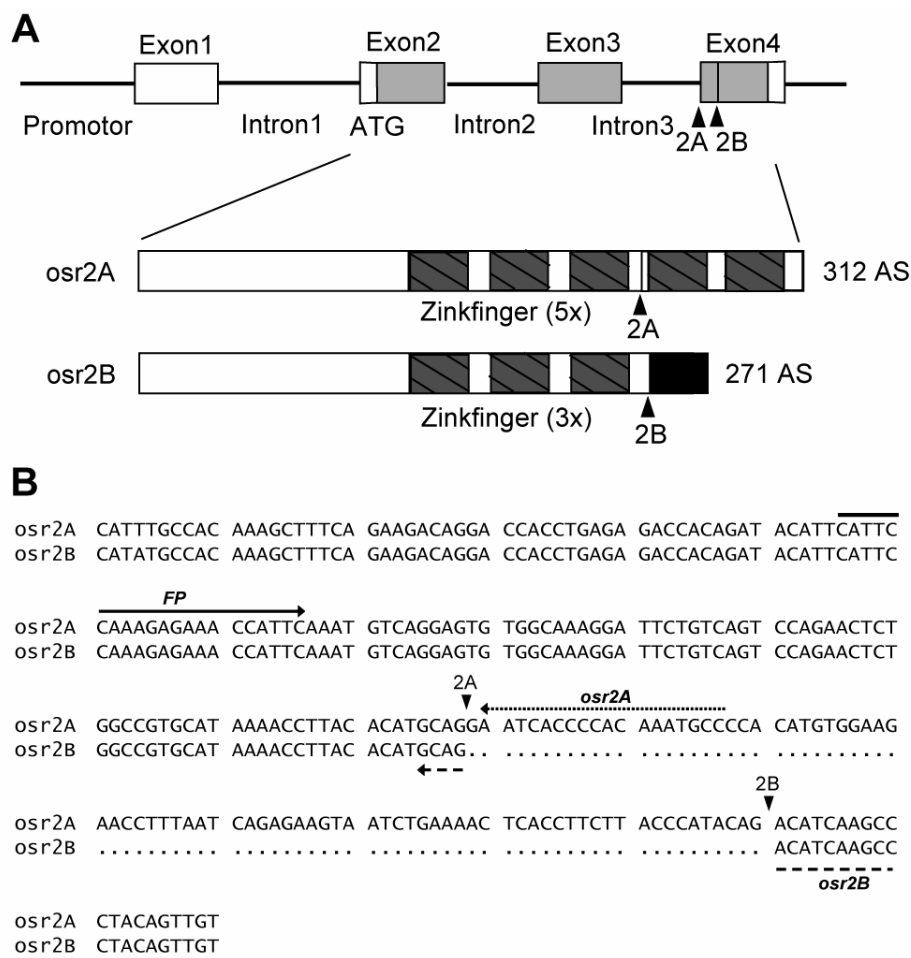


Abb. 7: Splicevarianten von *osr2*. Legende siehe nächste Seite.

Abb. 7: Splicevarianten von *osr2*. (A) Die schematische Darstellung der *Xenopus osr2* Splicevarianten A und B basierend auf den Daten des Maus-Gens (Kawai et al., 2005) zeigt die alternativen Splicepositionen in Exon 4 für 2A und 2B (Pfeilspitzen). Die Boxen stehen für Exons und die gefüllten Bereiche repräsentieren den offenen Leserahmen. Die Linien stellen den Promotor und die Introns dar. Im unteren Bereich sind schematisch die Zinkfingerdomänen (grau schraffiert) in beiden *osr2* Varianten (fünf Zinkfinger in *osr2A* und drei in *osr2B*) dargestellt. Die schwarze Box in *osr2B* markiert das alternativ gesplice Exon 4. (B) Das Alignment der Nukleotidsequenzen um das alternativ gesplice Exon 4 basiert auf der *Xenopus laevis osr2B* cDNA (Accession No. BC108579) und der korrespondierenden *osr2A* cDNA von *Xenopus tropicalis* (Accession No.: CU075721), die in Ermangelung einer korrekten *Xenopus laevis osr2A* Sequenz eingesetzt wurde. Die Nukleotidsequenzen im Bereich der alternativen Splicepositionen (durch Pfeilspitzen angezeigt) ist in beiden Spezies identisch. Der forward Primer (FP) ist für beide Splicevarianten gleich. Die Unterscheidung von *osr2A* und B erfolgt mittels verschiedener reverse Primer (*osr2A*: gepunktete Linie; *osr2B*: gestrichelte Linie).

Um die mRNA-Expression beider Splicevarianten in mit Aktivin A und Retinsäure induzierten animalen Kappen zu untersuchen, wurden für die quantitativen realtime-PCR-Ansätze ein identischer forward Primer und zwei verschiedene reverse Primer, die zwischen *osr2A* und B unterscheiden, eingesetzt (Abb. 7B). Die animalen Kappen wurden im späten Blastulastadium geschnitten. Für die Zeitpunkte 1,5 und drei Stunden wurden animale Kappen untersucht, die mit 10ng/ml Aktivin A und 10^{-4} M Retinsäure inkubiert wurden. Die Analyse der Zeitpunkte fünf, sieben und 13 Stunden enthielt animale Kappen, die für drei Stunden mit Aktivin A und Retinsäure behandelt und anschließend für die restliche Zeit in Steinberg Lösung kultiviert wurden. In Abbildung 8 ist die mRNA-Expression von *osr2A* und B prozentual zur Expression des „Housekeeping Gens“ *odc* dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass *osr2B* während des untersuchten Zeitintervalls von 13 Stunden mehr als dreimal stärker in induzierten animalen Kappen exprimiert ist als *osr2A*. Diese dominante Expression von *Osr2B* im Vergleich zu *Osr2A* wurde auch in den verschiedensten Organen der Maus beobachtet (Kawai et al., 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, in allen Versuchen nur die mRNA-Expression von *osr2B* in animalen Kappen zu untersuchen, statt wie zuvor ein allgemeines Primerpaar zu nutzen, das beide Splicevarianten amplifiziert.

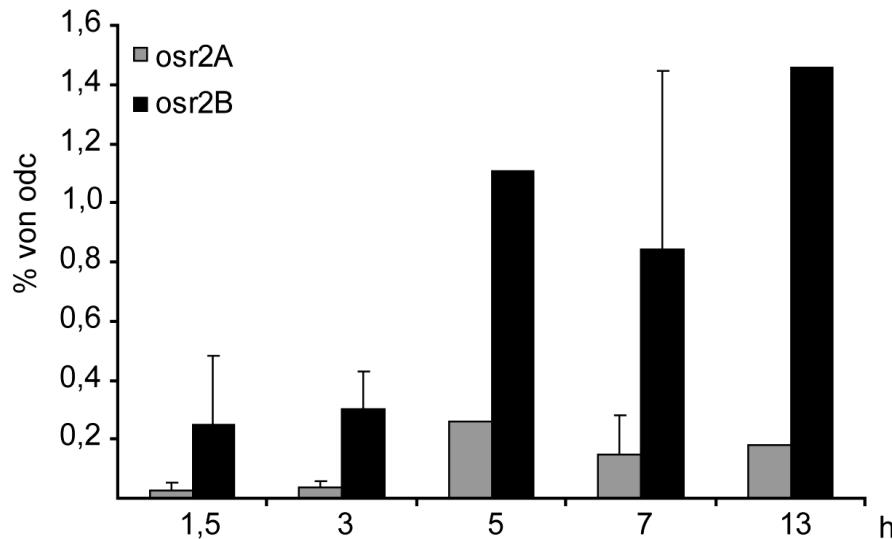


Abb. 8: Die mRNA-Expression von osr2B übersteigt die von osr2A um mehr als Dreifache in Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen. Animale Kappen wurden in der späten Blastula (Stadium 9; Nieuwkoop und Faber, 1975) geschnitten und für 1,5 bzw. drei Stunden in Aktivin A (10ng/ml) und Retinsäure (10^{-4} M) inkubiert. Für die fünf, sieben und 13 Stundenbehandlung wurden sie nach drei Stunden für die restliche Zeit in Steinberg Lösung kultiviert. Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer realtime-PCR unter Verwendung der osr2A und osr2B spezifischen Primer bestimmt und die Ergebnisse zur odc-Expression normalisiert und prozentual dargestellt. Wenn zwei unabhängige Gruppen von animalen Kappen analysiert wurden, ist der Mittelwert mit der Standardabweichung angegeben.

3.2.3 Identifikation induzierter Gene in animalen Kappen mittels Mikroarray

Um einen genaueren Einblick zu erhalten, welche Gene außerdem noch von Aktivin A und Retinsäure induziert werden, wurde eine Mikroarrayanalyse von behandelten im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen vorgenommen. Hierzu wurde der GeneChip® *Xenopus laevis* Genome Array von Affymetrix eingesetzt. Mit diesem Mikroarray ist es möglich, die Genexpression von mehr als 14.400 *Xenopus laevis* Transkripten zu untersuchen.

Die Expressionsprofilanalyse der induzierten animalen Kappen sollte zu einem möglichst frühen Zeitpunkt durchgeführt werden, um nur direkte Zielgene von Aktivin A und Retinsäure erfassen zu können. Da nach 1,5 Stunden bereits die ersten frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen induziert sind

(s. 3.2.1), wurden behandelte und unbehandelte animale Kappen nach 1,5 Stunden Inkubation eingesetzt und die Expressionsprofile von zwei unabhängigen Versuchen miteinander verglichen. Beim ersten Versuch waren die RNA-Proben leicht mit DNA verunreinigt, was zu einer geringeren Sensitivität und damit zur Detektion weniger regulierter Gene im Vergleich zum zweiten Versuch führte. Im ersten Versuch wurden 85 und im zweiten 269 hochregulierte Gene gefunden. Des Weiteren fanden sich im zweiten Versuch 337 herunterregulierte Gene. Im ersten Versuch ließ sich hingegen keine Herunterregulation feststellen.

Die Analyse der Mikroarraydaten ergab 82 induzierte Gene in beiden Versuchen, von denen 40 Gene stark hochreguliert waren (Änderung $\geq 1,5$, $p < 0,002$; Tab. 4 und 5). Weitere, weniger stark induzierte Gentranskripte (Änderung $\geq 1,0$ und $< 1,5$, $p < 0,002$) sind in Tabelle 8 im Anhang aufgelistet. Waren die Probesets nicht bei Xenbase (Bowes et al., 2010) gelistet, so wurde das mit diesem Probeset zu detektierende Gen, wenn möglich, über die „Probe Design Information“ bei Affymetrix (Affymetrix, 2010) identifiziert. Oft war das Probeset dann nur teilweise (70-93%) komplementär oder identifizierte ein korrespondierendes *Xenopus tropicalis* Gen.

Etwas mehr als ein Drittel der Gene, die durch Aktivin A und Retinsäure stark reguliert wurden, kodieren für Transkriptionsfaktoren, von denen die meisten Homeoboxfaktoren sind (Tab. 4). Darüber hinaus ist die Genexpression von vielen Signalmolekülen induziert (Tab. 5). Unter ihnen befinden sich fgf8 (Grieshammer et al., 2005; Perantoni et al., 2005; Colas et al., 2008) und wnt11b (Tételin and Jones, 2010), die eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung spielen, und das Retinsäure metabolisierende Cytochrom-P450-Enzym cyp26a1 (Duester, 2008). Ebenfalls von direkter oder indirekter Bedeutung in der Nierenentwicklung sind die induzierten Homeoboxfaktoren mix1 (Colas et al., 2008) und mixer (Kofron et al., 2004) (Tab. 4). Des Weiteren ist die Genexpression von Signalmolekülen wie z.B. nodal1 und nodal2 (Jones et al., 1995; Takenaga et al., 2007) induziert, die die Mesodermentwicklung beeinflussen (Tab. 5). Außerdem konnten Faktoren apoptotischer Prozesse identifiziert werden (Tab. 5).

Für vegt (Tab. 4), lefty und cyp26a1 (Tab. 5) befinden sich jeweils zwei Probesets auf dem Mikroarray, die die jeweiligen durch Genduplikation in *Xenopus laevis* entstandenen Pseudoallele detektieren. Für vegt und cyp26a1 konnte mit beiden Probesets eine in etwa vergleichbare Induktion der Expression der jeweiligen Gene detektiert werden, während sich die von lefty stark unterschieden.

Alle zehn Gene, deren Expression sich von *absent* in unbehandelten zu *present* in behandelten animalen Kappen änderte, wiesen eine mehr als fünffache Induktion auf. Die reale Induktion ist allerdings vermutlich geringer, da die Induktion im Vergleich zur abwesenden Expression in der Kontrolle nur ein berechneter Schätzwert ist.

Tab. 4: Transkriptionsfaktoren, die nach 1,5 Stunden Inkubation mit Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert waren. Die in beiden unabhängigen Versuchen hochregulierten Gene (Änderung $\geq 1,5$, $p < 0,002$) und der Mittelwert ihrer x-fachen Induktion sind aufgelistet. Waren die Probesets bei Xenbase (Bowes et al., 2010) gelistet, so wurden das Gensymbol und der Genname aus Xenbase übernommen. Ließ sich der Genname über Affymetrix identifizieren, so wurde das entsprechende Gensymbol (Xenbase), wenn bekannt, zusätzlich in Klammern eingefügt. Nicht fett gedruckte Zahlen: Änderung von *absent* in unbehandelten zu *present* in behandelten animalen Kappen; (p) provisorischer Name bei Xenbase (Stand August 2010); [1] nicht bei Xenbase gelistet (Stand August 2010); [2] nach UniGene (Unigene, 2010) in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009); [3] nach „Target Sequence“ in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009).

Gensymbol	Genname	Probeset	x-fache Induktion
Homeoboxproteine			
bix2 (p)	homeobox protein BIX2	XI.397.1.S1_at	30,4
bix4 (p)	homeobox protein BIX4	XI.399.1.S1_at	22,2
bix1.1	Brachyury-inducible homeobox 1, gene 1	XI.298.1.S1_at	20,0
bix3 (p)	homeobox protein BIX3	XI.398.1.S1_at	12,0
hoxd1	homeobox protein D1	XI.3370.1.S1_at	6,7
mix1	mix1 homeobox	XI.824.1.S1_at	10,6
---	hypothetical protein LOC100137681 [3], zu 87% vergl. zu mix3 (mixer (p)) [2]	XI.16875.1.A1_at [1]	8,5
not	notochord homeobox	XI.35.1.S1_at	3,2
---	homeobox protein Xnot2 [2, 3]	XI.1066.1.A1_at [1]	2,8
T-Box Familien Mitglieder			
eomes	eomesodermin	XI.373.1.S1_at	10,5
vegt (p)	vegt protein	XI.1775.1.S1_at XI.3520.1.S1_at	3,9 3,3
weitere Transkriptionsfaktoren			
foxi4.2 (p)	forkhead box I4, gene 2	XI.5369.1.S1_at	1,9
sox17b.1	SRY (sex determining region Y)-box 17 beta, gene 1	XI.44.1.S1_at	1,9
mx1	Max interector 1	XI.3075.1.A1_at	1,6
xbp1	X-box binding protein 1	XI.4624.1.A1_a_at	1,5

Tab. 5: Gentranskripte, die nach 1,5 Stunden Inkubation mit Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert waren. Legende siehe nächste Seite.

Gensymbol	Genname	Probeset	x-fache Induktion
Signalmoleküle			
TGF-beta Familien Mitglieder			
lefty	left-right determination factor	Xl.1044.1.S1_at Xl.708.1.S1_at	15,5 6,4
FGF Signalweg			
fgf8	fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)	Xl.20011.1.S1_at	3,4
rasl11b	RAS-like, family 11, member B	Xl.13019.1.S1_at	2,3
---	hypothetical protein LOC431908 [3], zu 91% vergl. zu MAP kinase activator 2 [3]	Xl.20670.1.S1_at [1]	2,2
Retinsäure Katabolismus			
cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Xl.7015.1.A1_at	7,4
---	retinoic acid converting enzyme, cyp26a1 [2, 3]	Xl.456.1.S1_at [1]	5,2
wnt Signalweg			
wnt11b (p)	wingless-type MMTV integration site family, member 11B	Xl.1073.1.S1_at	3,4
nodal Signalweg			
nodal2 (p)	nodal homolog 2	Xl.1038.1.S1_at	13,8
nodal1 (p)	nodal homolog 1	Xl.1037.1.S1_at	5,2
notch Signalweg			
dll1	delta-like 1	Xl.14759.1.A1_at	2,5
Apoptose			
sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	Xl.7842.1.S1_at	1,7
cidea	cell death-inducing DFFA-like effector a	Xl.25419.1.S1_at	1,5
gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	Xl.12125.1.S1_at	1,5
---	Clone 31 polo-like kinase 3 (plk3) [2]	Xl.16835.1.S1_at [1, 5]	1,5
rhoul	ras homolog gene family, member U	Xl.4621.1.A1_at	1,5
weitere Gene			
dhrs3 (p)	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	Xl.13360.1.A1_at	8,5
---	zu 90% vergl. zu hyalurona synthase 2 (has2) [3]	Xl.2967.1.A1_at [1]	6,0
---	zu 90% vergl. zu growth arrest specific 1 (gas1 (p)) [3,4]	Xl.16153.1.A1_at [1]	2,3
---	71 kDa protein [2,3]	Xl.3352.1.S1_at [1]	4,8
---	---	Xl.11148.1.A1_at [1,5]	2,1
---	hypothetical protein LOC432134 [2]	Xl.24168.2.A1_at [1, 5]	1,9
---	---	Xl.2954.1.A1_at [1, 5]	1,7
---	p75-like transmembrane protein fullback [2, 3]	Xl.3540.1.S1_at [1]	1,6
zswim4	zinc finger, SWIM-type containing 4	Xl.2486.1.A1_at	1,6
znf706.2 (p)	zinc finger protein 706, gene2	Xl.7042.1.S1_at	1,5
---	MGC80709, zu 93% vergl. zu chromosome 11 open reading frame 73 [2, 3]	Xl.6804.1.A1_at [1]	1,5

Tab. 5: Gentranskripte, die nach 1,5 Stunden Inkubation mit Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert waren. Die in beiden unabhängigen Versuchen hochregulierten Gene (Änderung $\geq 1,5$, $p < 0,002$) und der Mittelwert ihrer x-fachen Induktion sind aufgelistet. Die Gene sind in verschiedene Gruppen nach ihrer Funktion oder Beteiligung in Signalwegen eingeteilt. Gensymbol und Genname stammen von Xenbase (Bowes et al., 2010), wenn das Probeset gelistet war. Wurde der Genname über Affymetrix identifiziert, so wurde das entsprechende Gensymbol (Xenbase), wenn bekannt, zusätzlich in Klammern eingefügt. Nicht fett gedruckt: Änderung von *absent* in unbehandelten zu *present* in behandelten animalen Kappen; (p) provisorischer Name bei Xenbase (Stand August 2010); [1] nicht bei Xenbase gelistet (Stand August 2010); [2] nach UniGene (Unigene, 2010) in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009); [3] nach „Target Sequence“ in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009); [4] Probeset detektiert *Xenopus tropicalis*; [5] Sequenz bei NCBI für *Xenopus* nicht gefunden (Stand August 2010).

Eine erhöhte Expression von *osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1*, wie in der quantitativen realtime-PCR-Analyse nach 1,5 Stunden (s. 3.2.1), konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die Analyse der Probesets ergab, dass mit den Sonden (Probes) gegen *osr1* und *lhx1* diese nicht detektiert werden können, da die Sequenzen nicht komplementär zu *osr1* bzw. *lhx1* sind. Für *osr2* findet sich gar kein Probeset auf dem Mikroarray. Die Probesets für *hnf1b* und *pax8* dagegen waren korrekt. Trotzdem konnte *hnf1b*, welches bereits nach 1,5 Stunden in animalen Kappen induziert ist, nicht detektiert werden. Auch auf der neuen Version des Mikroarrays, dem GeneChip® *Xenopus laevis* Genome 2.0 Array von Affymetrix, befinden sich keine komplementären Probesets für *osr1*, *osr2* und *lhx1*.

Aus einem Mangel an geeigneten Probesets für *osr1*, *osr2* und *lhx1* bzw. ausreichender Sensitivität im Vergleich zur quantitativen realtime-PCR im Falle der Detektion von *hnf1b* sowie aufgrund der Schwierigkeit der Identifikation von Probesets und der hohen Kosten einer Mikroarrayanalyse wurde diese Methode nicht weiter eingesetzt. Die mRNA-Expression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren und weiterer nephrogenetischer Faktoren wurde daher nur noch mittels quantitativer realtime-PCR analysiert.

3.2.4 Induktion der mRNA der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in Aktivin A oder Retinsäure induzierten animalen Kappen

Um zu klären, welche frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren von Aktivin A oder Retinsäure allein induziert werden, wurden animale Kappen mittels quantitativer realtime-PCR analysiert, die für drei Stunden mit Aktivin A (ActA) oder Retinsäure (RA) induziert wurden. Die Expressionsprofile von behandelten und unbehandelten animalen Kappen wurden nach drei Stunden verglichen und als x-fache Induktion in Abbildung 9 dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an analysierten Gruppen von animalen Kappen (RA: N=5; ActA: N=4; RA+ActA: N=4) konnte nicht bestimmt werden, ob die Werte normalverteilt sind, und somit keine statistische Auswertung erfolgen. Gene wurden als induziert oder reprimiert definiert, wenn für alle unabhängigen Messungen der Wert größer bzw. kleiner als eins war.

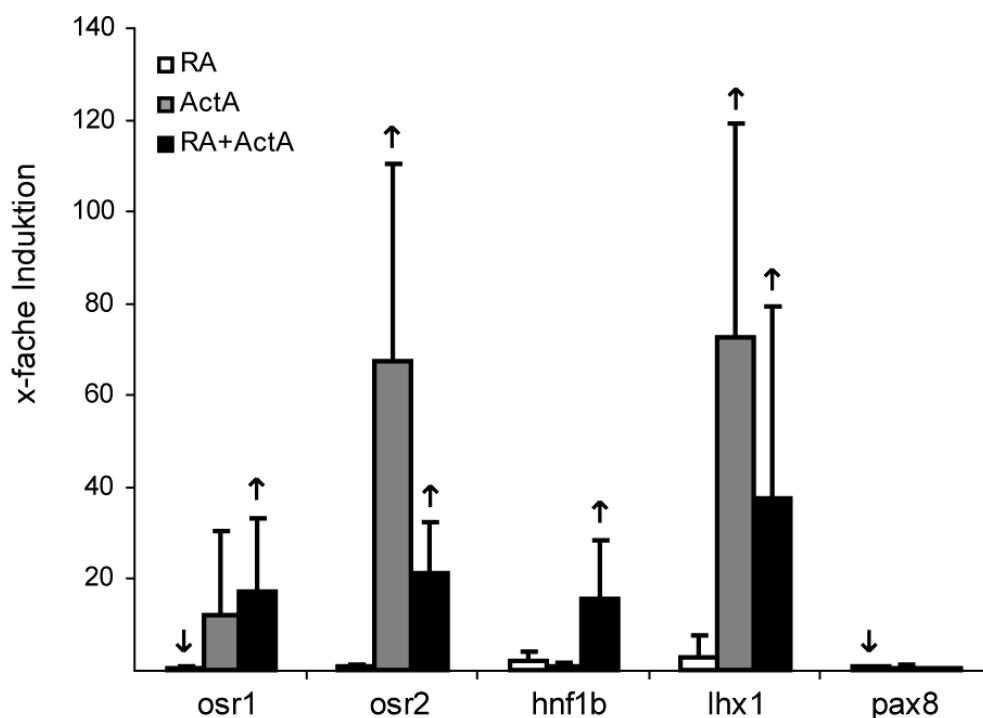


Abb. 9: Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in Aktivin A und/oder Retinsäure behandelten animalen Kappen. Animale Kappen wurden im späten Blastulastadium 9 (Nieuwkoop and Faber, 1975) geschnitten und für drei Stunden in Aktivin A (ActA) und/oder Retinsäure (RA) inkubiert. Danach wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt und als x-fache Induktion der einzelnen mRNAs im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen dargestellt. Eine eindeutige Induktion (Faktor > 1) in allen getesteten Gruppen von animalen Kappen (RA: N=5; ActA: N=4; RA+ActA: N=4) ist durch einen nach oben weisenden Pfeil und eine klare Repression (Faktor < 1) mit einem nach unten weisenden Pfeil gekennzeichnet.

Die Behandlung mit Retinsäure führte zu keiner Induktion der fünf Transkriptionsfaktoren, sondern stattdessen zu einer um mehr als die Hälfte reduzierten Expression von *osr1* und *pax8* im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen. Dagegen wurden durch die Behandlung mit Aktivin A in den animalen Kappen nach drei Stunden *osr2* und *lhx1* induziert. Im Falle von *osr1* kann von keiner Induktion in Aktivin A induzierten animalen Kappen gesprochen werden, da in zwei Fällen die Expression erhöht und in zweien erniedrigt war. Dass *osr1* und *hnf1b* nicht von Aktivin A allein, allerdings in Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen induziert wurden, lässt darauf schließen, dass ein synergetischer Effekt beider Faktoren nötig ist, um *osr1* und *hnf1b* zu induzieren. Die fehlende Induktion von *pax8* in Aktivin A oder Retinsäure behandelten Kappen war zu erwarten, da auch in animalen Kappen, die mit beiden Faktoren behandelt wurden, nach drei Stunden keine Induktion festgestellt werden konnte (vergleiche Abb. 6).

3.3 Überexpression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren

Zur Analyse des Einflusses der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* auf die Pronephrosentwicklung wurden die mRNAs der homologen Gene des Menschen oder der Maus injiziert und ihr Effekt in Embryonen bzw. animalen Kappen untersucht. Der Einsatz der Homologe wurde gewählt, um in den durchgeführten Versuchen gegebenenfalls zwischen exogenen und endogenen mRNAs zu unterscheiden.

3.3.1 Überexpression des humanen *OSR1* und des *Osr2A* der Maus in *Xenopus laevis* Embryonen

Es wurde bereits von Tena et al. (2007) gezeigt, dass die Überexpression der *Xenopus* Proteine *osr1* und *osr2* in Embryonen jeweils zu einer Vergrößerung des Pronephros führt. Des Weiteren bildet sich häufig ektopisches Nierengewebe, in dem die frühen Transkriptionsfaktoren *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* induziert sind.

Um festzustellen, ob das morphogenetische Potential des humanen *OSR1* und des Maus-*Osr2A* auf den sich entwickelnden *Xenopus laevis* Embryo vergleichbar zu den *Xenopus* Proteinen ist, wurde die jeweilige mRNA, die für diese Proteine kodiert, in

ein Blastomer des Zweizellstadiums injiziert. Zusätzlich zu der mRNA der zu untersuchenden Gene wurde GFP (**g**reen **f**luorescence **p**rotein) mRNA injiziert, um im Schwanzknospenstadium die injizierte Seite der Embryonen anhand der grünen Fluoreszenz zu identifizieren.

Etwa die Hälfte der mit 200pg OSR1 und mehr als die Hälfte der mit 200pg Osr2A mRNA injizierten Embryonen wiesen starke Gastrulationsdefekte (Exogastrulation) auf. Dieser Effekt ist auch bei geringeren Konzentrationen zu beobachten, nimmt aber mit erhöhter mRNA-Konzentration stark zu. Bei der Exogastrulation handelt es sich um eine anormale Form der Gastrulation, bei der das Mesoendoderm anstatt ins Innere nach außen wandert und eine hantelförmige Struktur entsteht. Solche Embryonen sind dadurch nicht mehr fähig sich weiterzuentwickeln und sterben ab. Aufgrund der mit der Konzentration zunehmenden Sterblichkeitsrate konnten keine höheren mRNA-Konzentrationen als 200pg injiziert werden. Die Exogastrulation wurde ebenfalls für die Überexpression der korrespondierenden *Xenopus* Faktoren beschrieben (Tena et al., 2007).

Im Stadium 45 (Nieuwkoop and Faber, 1975) wurden die überlebenden freischwimmenden Larven fixiert und der Pronephros durch Immunhistofärbung mittels der zwei monoklonalen Erstantikörper gegen die Tubuli (3G8) und den Ductus (4A6) (Vize et al., 1995) und einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Als Kontrolle dienten Embryonen, die nur mit GFP injiziert wurden (Daten aus Wu et al., 2004 übernommen). Die Mehrheit der OSR1 und Osr2A injizierten Embryonen wiesen eine Vergrößerung der Pronephri auf (Abb. 10A). Diese Pronephrosvergrößerung ging bei vier von 35 OSR1 injizierten Embryonen mit der Bildung ektopischen Nierengewebes einher (Abb. 10B). In Osr2A injizierten Embryonen dagegen entwickelte sich kein ektopisches Nierengewebe.

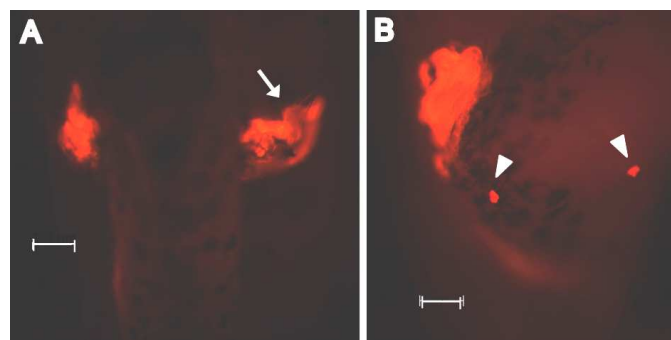


Abb. 10: Einfluss des überexprimierten OSR1 auf die Morphologie des Pronephros in *Xenopus laevis* Embryonen. Legende siehe nächste Seite

Abb. 10: Einfluss des überexprimierten OSR1 auf die Morphologie des Pronephros in *Xenopus laevis* Embryonen. Im Zweizellstadium wurde in ein Blastomer 200pg OSR1 mRNA zusammen mit 100pg GFP mRNA injiziert. Die freischwimmenden *Xenopus* Larven wurden im Stadium 45 (Nieuwkoop and Faber, 1975) fixiert und die Pronephri immunhistochemisch sichtbar gemacht, erkennbar an der roten Fluoreszenz. Der Balken entspricht 200µm. (A) zeigt die dorsale Ansicht einer solchen Larve. Die injizierte Seite mit dem vergrößerten Pronephros ist durch einen weißen Pfeil markiert. In (B) ist die laterale Ansicht der injizierten, rechten Seite einer Larve dargestellt (Kopf weist nach oben). Das ektopische Nierengewebe ist durch weiße Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Der phänotypische Effekt der Überexpression auf die Pronephrosentwicklung wurde durch den Vergleich der Pronephrosgrößen der injizierten mit der nicht injizierten Seite statistisch analysiert. Da von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden kann (Dudziak et al., 2008), wurde der t-Test eingesetzt, um eine signifikante Änderung der Pronephrosgröße festzustellen. In Abbildung 11 ist die statistische Auswertung der Ergebnisse dargestellt.

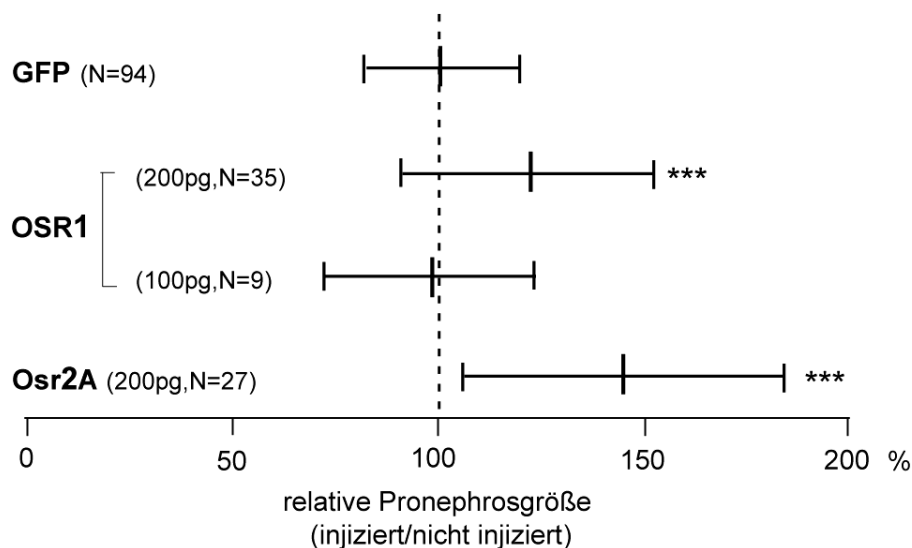


Abb. 11: Statistische Auswertung der Pronephrosgrößen nach Überexpression von GFP, OSR1 oder Osr2A. Die Pronephri wurden immunhistochemisch sichtbar gemacht, aus lateraler Sicht fotografiert und mit Hilfe der Auswertungssoftware AxioVision 4.6 (Carl Zeiss Imaging Solutions) die Pronephrosgröße gemessen. Die injizierte wurde mit der nicht injizierten Seite verglichen. Waren die Pronephri in einem Embryo auf beiden Seiten gleich groß, so entsprach die relative Pronephrosgröße 100%. Der t-Test wurde eingesetzt, um die Stichproben mit den Daten der GFP-injizierten Embryonen (Daten übernommen aus Wu et al., 2004) zu vergleichen (*** p-Wert $\leq 0,001$). Die vertikale Linie in der Mitte stellt den Mittelwert der Werte für das jeweilige Protein und die kleineren Linien die Standardabweichung zu beiden Seiten dar. N ist die Anzahl der analysierten Embryonen.

In GFP injizierten Embryonen war keine Veränderung der Pronephrosgröße festzustellen. Dagegen führten sowohl OSR1 als auch Osr2A zu einer signifikanten Zunahme der Pronephrosgröße (Abb. 11). Die Vergrößerung des Pronephros ist allerdings abhängig von der injizierten Konzentration. So bewirkte die Injektion von 200pg OSR1 mRNA einen signifikant vergrößerten Pronephros, während mit 100pg kein Effekt auf die Pronephrosgröße zu beobachten war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von OSR1 und Osr2A ebenso wie die korrespondierenden *Xenopus* Proteine (Tena et al., 2007) zu einer Vergrößerung der Pronephri führt. Dies lässt auf eine vergleichbare Funktion beider Gene in der Pronephrosentwicklung schließen.

3.3.2 Überexpression des humanen OSR1 in animalen Kappen

Aufgrund der Beobachtung, dass die Überexpression von *osr1* oder *osr2* in *Xenopus laevis* Embryonen die Expression von *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* induziert (Tena et al., 2007), stellte sich die Frage, ob einer dieser nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren die Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen auslösen kann. Da die Expression von OSR1 eine etwas geringere Letalität im Vergleich zu Osr2A aufweist, OSR1 zusätzlich ektopisches Nierengewebe induzieren kann (s. Abb. 10B) und eine vergleichbare Funktion beider Gene in der Pronephrosentwicklung angenommen werden kann (s. 3.3.1), wurde OSR1 überexprimiert.

150pg OSR1 mRNA (je Blastomere 75pg) wurden zusammen mit 100pg GFP in den animalen Pol von *Xenopus laevis* Embryonen im Zweizellstadium injiziert und im späten Blastulastadium 9 (Nieuwkoop and Faber, 1975) animale Kappen geschnitten. Eine höhere Konzentration an OSR1 mRNA konnte nicht injiziert werden, da zu viele Embryonen bei einer Konzentration von 200pg starben (s. 3.3.1). Die geschnittenen animalen Kappen wurden für drei Stunden in Steinberg Lösung inkubiert und dann zur Expressionsanalyse mittels quantitativer realtime-PCR in Gruppen von 30 animalen Kappen zusammengefasst oder für insgesamt vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert, anschließend fixiert und mittels der nierenstruktur-spezifischen Antikörper 3G8 und 4A6 (Vize et al., 1995) immunhistochemisch angefärbt. Für die Analyse wurden nur animale Kappen von Embryonen eingesetzt, die einen Tag nach der Injektion eine grüne Fluoreszenz (erfolgreiche Injektion) aufwiesen. Als Positivkontrolle wurden animale Kappen von nicht injizierten Embryonen geschnitten

und für drei Stunden mit Aktivin A und Retinsäure induziert. Unbehandelte animale Kappen dienten als Negativkontrolle.

Es fiel auf, dass die animalen Kappen von OSR1 injizierten Embryonen sich im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen langsamer oder teilweise auch gar nicht abkugelten. Diese Probleme in der Bildung der ballartigen Struktur animaler Kappen, die üblicherweise nach ca. 30 Minuten nach dem Schneiden abgeschlossen ist, könnten auf einen möglichen Einfluss von OSR1 auf das Cytoskelett hinweisen.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ist in Abbildung 12A dargestellt. Da das Ausmaß der Differenzierung zwischen den einzelnen induzierten animalen Kappen variierte, wurden die immunhistochemisch gefärbten Kappen wie in Kapitel 3.1, Abb. 5A, in drei verschiedene Kategorien eingeteilt. Aktivin A in Kombination mit Retinsäure (Positivkontrolle) induzierte eine klare Pronephrosdifferenzierung im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen, wie auch bereits von Moriya et al. (1993) beschrieben. Allerdings konnte in OSR1 überexprimierenden animalen Kappen keine pronephrische Differenzierung festgestellt werden. Auch eine zusätzliche Behandlung dieser animalen Kappen mit Retinsäure oder Aktivin A für drei Stunden führte zu keiner Pronephrosentwicklung *in vitro*. Darüber hinaus zeigte ebenso die Inkubation OSR1 überexprimierender animaler Kappen mit Aktivin A und Retinsäure für drei Stunden keine gesteigerte Pronephrosdifferenzierung im Vergleich zur nicht injizierten Positivkontrolle.

In der quantitativen realtime-PCR-Analyse nach drei Stunden konnte keine Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in OSR1 überexprimierenden animalen Kappen allein oder in Kombination mit Retinsäure festgestellt werden (Abb. 12B). Dagegen wiesen diese Kappen mit Aktivin A inkubiert eine Induktion von *osr1*, *osr2* und *lhx1* auf, wie es auch bei der Behandlung mit Aktivin A allein zu beobachten war (vergleiche Abb. 9). Auch die Induktionen von *osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1* in OSR1 überexprimierenden animalen Kappen behandelt mit Aktivin A und Retinsäure sind vergleichbar mit denen animaler Kappen, die nur mit Aktivin A und Retinsäure inkubiert wurden.

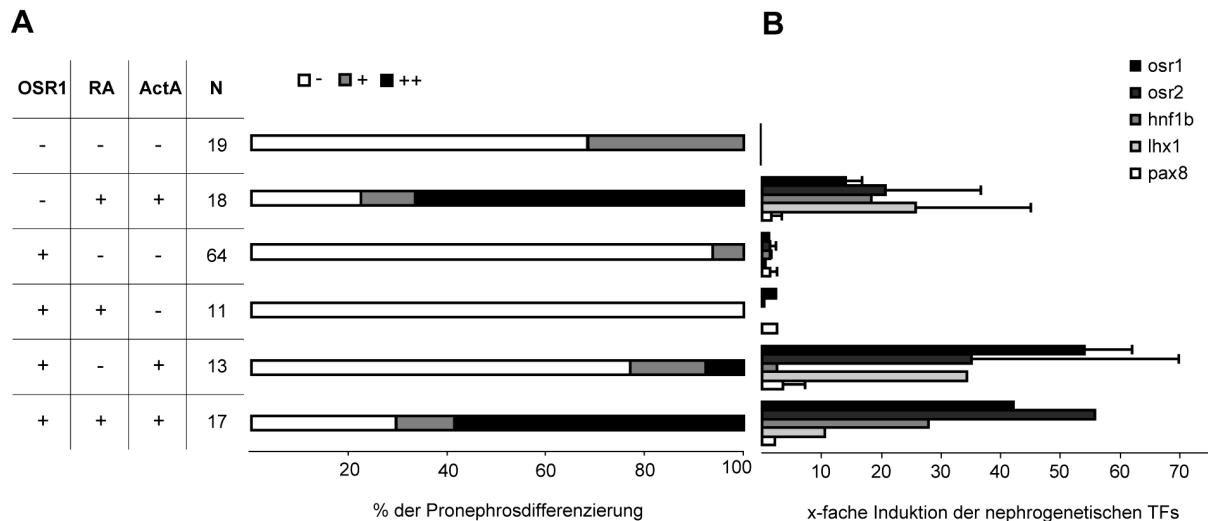


Abb. 12: Überexpression von OSR1 in animalen Kappen. Animale Kappen von OSR1 (150pg) injizierten Embryonen wurden in Steinberg Lösung oder Retinsäure (RA, 10^{-4} M) und/oder Aktivin A (ActA, 10ng/ml) für drei Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie auf die Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren mittels quantitativer realtime-PCR untersucht oder für vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert und die Pronephrosdifferenzierung mittels Immunhistofärbung analysiert. (A) zeigt die Auswertung der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen nach vier Tagen, die wie links in der Tabelle beschrieben behandelt wurden. Das Ausmaß der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen wurde in drei Kategorien eingeteilt: - keine Pronephrosentwicklung, + zwei oder mehr kleinere Stellen bestehend aus Pronephroszellen, ++ tubuli-ähnliche Strukturen (vergleiche auch Abb. 5A). N ist die Anzahl der analysierten animalen Kappen. (B) Die mRNA-Expression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren (TFs) in den unterschiedlich behandelten animalen Kappen wurde mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt und die x-fache Induktion der einzelnen mRNAs im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen dargestellt. Wurden zwei unabhängige Gruppen von animalen Kappen getestet, so ist die Standardabweichung angegeben. Die Ergebnisse OSR1 injizierter animaler Kappen mit RA allein oder in Kombination mit ActA stammen genauso wie die Werte für die hnf1b Expression (Ausnahme OSR1 Injektion: zwei unabhängige Experimente) jeweils von einem Experiment.

Als Kontrolle, dass die injizierte OSR1 mRNA in den animalen Kappen translatiert und das OSR1 Protein exprimiert wurde, wurden die Embryonen, von denen die animalen Kappen geschnitten wurden, mittels Western Blot analysiert (Abb. 13). Zum Nachweis des myc-getaggten OSR1 Proteins wurde der monoklonale Maus-anti-myc-Antikörper 9E10 eingesetzt. Um unspezifische Bindungen des Erstantikörpers zu erkennen, wurde außerdem das Lysat von unbehandelten Embryonen (Contr)

eingesetzt. Wie der Western Blot zeigt, war in den OSR1 injizierten Embryonen das OSR1 Protein exprimiert.

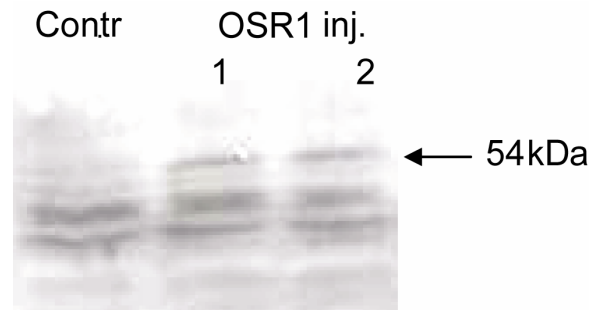


Abb. 13: Nachweis des überexprimierten OSR1 Proteins in OSR1 injizierten Embryonen.

Nachdem die animalen Kappen von OSR1 injizierten Embryonen in der späten Blastula (Stadium 9; Nieuwkoop and Faber, 1975) geschnitten wurden, wurde in den Proteinextrakten von jeweils zehn dieser Embryonen das humane OSR1 Protein mittels des monoklonalen anti-myc-Antikörpers 9E10 im Western Blot detektiert. Das exogene myc-getaggte OSR1 Protein mit einer Größe von ca. 54kDa ist in den zwei unabhängigen Proben 1 und 2 durch einen Pfeil markiert.

Wie die oben beschriebenen Versuche zeigen, hat OSR1 weder allein, noch in Kombination mit Aktivin A oder Retinsäure das Potential, eine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen zu induzieren.

3.3.3 Überexpression des humanen PAX8 und/oder LHX1 in animalen Kappen

Es ist bekannt, dass die Überexpression des *Xenopus* *lhx1* oder *pax8* in Embryonen zu einer Vergrößerung des Pronephros führt und die Coexpression beider Faktoren einen synergetischen Effekt hat (Carroll and Vize, 1999; Wu et al., 2004). Um das Pronephrosdifferenzierungspotential des humanen LHX1 und PAX8 in animalen Kappen zu untersuchen, wurden 250pg mRNA kodierend für diese Proteine allein oder in Kombination (je Blastomere 125pg) zusammen mit 100pg GFP in den animalen Pol von Zweizellstadium-Embryonen injiziert. Im späten Blastulastadium 9 (Nieuwkoop and Faber, 1975) wurden die animalen Kappen geschnitten und in

Steinberg Lösung kultiviert. Nach drei Stunden wurden die animalen Kappen mittels quantitativer realtime-PCR auf die mRNA-Expression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren untersucht oder nach vier Tagen Inkubation immunhistochemisch angefärbt und die Pronephrosdifferenzierung analysiert. Als Positivkontrolle dienten animale Kappen von nicht injizierten Embryonen, die für drei Stunden mit Aktivin A und Retinsäure induziert worden waren und nach vier Tagen eine Pronephrosdifferenzierung zeigten. Unbehandelte animale Kappen (Negativkontrollen) zeigten keine positive Färbung auf Nierenstrukturen.

Weder LHX1 und PAX8 allein oder in Kombination konnten eine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen induzieren (Abb. 14). Ebenfalls blieb die Expression der fünf frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen unverändert (Daten nicht gezeigt).

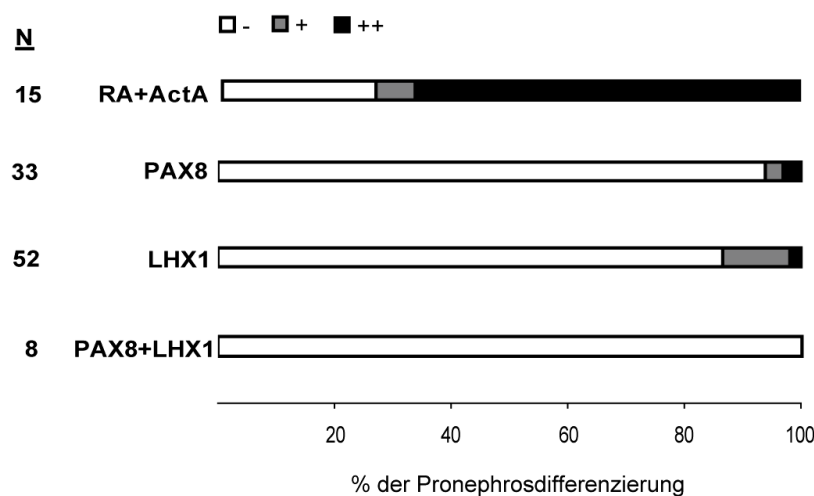


Abb. 14: Überexpression von PAX8 und LHX1 in animalen Kappen. Animale Kappen von PAX8 und/oder LHX1 (250pg allein oder 125pg von beiden) injizierten Embryonen wurden in Steinberg Lösung für vier Tage kultiviert. Als Positivkontrollen dienten Aktivin A (ActA, 10ng/ml) und Retinsäure (RA, 10^{-4} M) induzierte animale Kappen (Moriya et al., 1993). Die Pronephrosdifferenzierung wurde mittels Immunhistofärbung analysiert. Das Ausmaß der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen, die wie links beschrieben behandelt wurden, wurde in drei Kategorien eingeteilt (vergleiche auch Abb. 5A). N ist die Anzahl der analysierten animalen Kappen.

Für die Immunhistofärbung wurden nur animale Kappen von Embryonen eingesetzt, die eine grüne Fluoreszenz durch das coinjizierte GFP aufwiesen (erfolgreiche Injektion). Im Falle der LHX1 Injektion wurde außerdem die mRNA-Expression des LHX1 Zielgens Cerberus (*cer1*) (Yamamoto et al., 2003) nachgewiesen. Dieses war in LHX1 überexprimierenden animalen Kappen sechs- bis 64-fach induziert.

Zusammengefasst konnten LHX1 und PAX8 weder allein noch in Kombination eine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen induzieren. Diese fehlende Pronephrosentwicklung in LHX1 und PAX8 überexprimierenden animalen Kappen wurde ebenfalls kürzlich als unpublizierte Daten in einem Review beschrieben (Asashima et al., 2009).

3.3.4 Überexpression des humanen HNF1B in animalen Kappen

Die Überexpression von HNF1B in *Xenopus laevis* Embryonen führt zu Reduktion des Pronephros bis hin zur völligen Inhibition der Pronephrosbildung (Wild et al., 2000). Dies zeigt, dass HNF1B eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung spielt, lässt aber auch vermuten, dass HNF1B allein kein Pronephrosdifferenzierungspotential in animalen Kappen besitzt.

Wie allerdings die mRNA-Expressionsanalyse animaler Kappen, behandelt mit Aktivin A oder Retinsäure, gezeigt hat, kann Aktivin A allein *osr2*, *lhx1* und teilweise auch *osr1* induzieren (vergleiche 3.2.4, Abb. 9). Hingegen ist für die Induktion von *hnf1b* die Zugabe von Retinsäure notwendig. Im Hinblick auf diese Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Injektion von HNF1B die Gabe von Retinsäure ersetzen kann, um in mit Aktivin A behandelten animalen Kappen Pronephrosdifferenzierung zu induzieren.

Hierzu wurden 150pg HNF1B mRNA (75pg je Blastomere) zusammen mit 100pg GFP in den animalen Pol von Zweizellstadium-Embryonen injiziert, die animalen Kappen in der späten Blastula, Stadium 9 (Nieuwkoop and Faber, 1975), geschnitten und diese entweder für drei Stunden in Aktivin A (10ng/ml) oder nur in Steinberg Lösung kultiviert. Nach drei Stunden wurden die animalen Kappen mittels quantitativer realtime-PCR auf die mRNA-Expression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren untersucht oder nach vier Tagen Inkubation in Steinberg Lösung immunhistochemisch angefärbt und die Pronephrosdifferenzierung analysiert.

Mit Aktivin A und Retinsäure induzierte animale Kappen dienten als Positivkontrolle und unbehandelte animale Kappen als Negativkontrolle. Um eine erfolgreiche Injektion zu bestätigen, wurden alle injizierten Embryonen auf grüne Fluoreszenz untersucht und für die Immunhistofärbung nur animale Kappen von solchen Embryonen eingesetzt.

Die Ergebnisse der Immunhistofärbung zeigen, dass keine Pronephrosdifferenzierung in HNF1B überexprimierenden und Aktivin A behandelten animalen Kappen erzielt wurde (Abb. 15A), obwohl nach drei Stunden *osr1*, *osr2* und *lhx1*, aber nicht *hnf1b*, induziert waren (Abb. 15B). Dieses Expressionsprofil war jedoch zu erwarten, da auch eine alleinige Aktivin A Behandlung diese Transkripte induziert (vergleiche 3.2.4, Abb. 9). HNF1B kann also nicht die Zugabe von Retinsäure in Aktivin A behandelten animalen Kappen ersetzen.

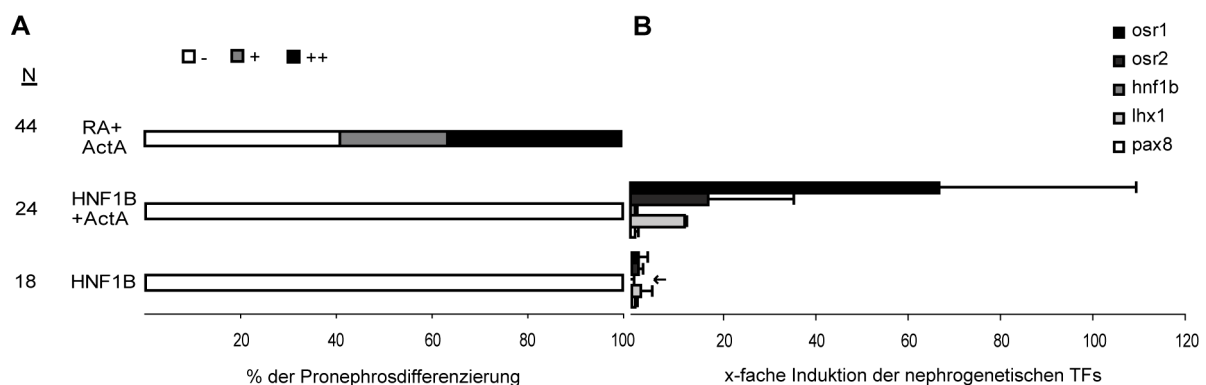


Abb. 15: Überexpression von HNF1B in animalen Kappen. Animale Kappen von HNF1B (150pg) injizierten Embryonen wurden in Steinberg Lösung oder Aktivin A für drei Stunden kultiviert. Anschließend wurden sie auf die Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren mittels quantitativer realtime-PCR untersucht oder für vier Tage in Steinberg Lösung kultiviert und die Pronephrosdifferenzierung mittels Immunhistofärbung analysiert. Als Positivkontrollen wurden animale Kappen eingesetzt, die mit Aktivin A (ActA, 10ng/ml) und Retinsäure (RA, 10^{-4} M) induziert wurden. (A) zeigt die Auswertung der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen nach vier Tagen, die wie links beschrieben behandelt wurden. Das Ausmaß der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen wurde in drei Kategorien eingeteilt (vergleiche auch Abb. 5A). N ist die Anzahl der analysierten animalen Kappen. (B) Die mRNA-Expression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren (TFs) in den unterschiedlich behandelten animalen Kappen wurde mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt und die x-fache Induktion der einzelnen mRNAs im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen dargestellt. Die Standardabweichungen von zwei (HNF1B+ActA) bzw. vier (HNF1B) unabhängigen Experimenten ist angegeben. Eine eindeutige Repression (Faktor < 1) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Wie bereits angenommen, konnte in HNF1B differenzierten animalen Kappen ohne Aktivin A Behandlung keine Pronephrosdifferenzierung beobachtet werden (Abb. 15A). Diese animalen Kappen zeigten in vier unabhängigen Experimenten keine Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren, aber eine dreifache Repression des endogenen *hnf1b* im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen (Abb. 15B).

Abschließend lässt sich sagen, dass HNF1B allein oder zusammen mit Aktivin A keine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen induzieren konnte.

3.4 Induktion wichtiger Gene der Nephrogenese in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen

Da viele Zielgene von HNF1B in Säugern identifiziert sind (Lokmane et al., 2010; Ryffel, 2010) oder aufgrund von potentiellen HNF1 Bindestellen in der Promotor-region postuliert wurden (Brunskill et al., 2008), war es interessant zu untersuchen, welche dieser Gene auch in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen aktiviert werden. So wurden mit Hilfe des *Xenopus* ESTs (Expressed Sequence Tags) Orthologe gesucht und 26 Gene ausgewählt, die früh in der *Xenopus* Entwicklung oder in der Niere exprimiert sind (Unigene, 2010). Es wurden animale Kappen von HNF1B injizierten Embryonen genommen (Vorgehen s. 3.3.4) und die Induktion dieser Transkripte nach sieben und 14 Stunden Inkubation in Steinberg Lösung mittels quantitativer realtime-PCR im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen analysiert. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da nach drei Stunden noch keine klare Veränderung der Expression zu sehen war (Daten nicht gezeigt). Da nur eine geringe Anzahl an Gruppen von 30 animalen Kappen (7h: N=5; 14h: N=4) analysiert wurde, war nicht eindeutig, ob eine Normalverteilung der Werte vorlag. Daher konnte keine statistische Auswertung erfolgen. War in allen Analysen eine mRNA im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen stärker (Faktor > 1) bzw. schwächer (Faktor < 1) exprimiert, so wurde eine Induktion bzw. Repression angenommen.

Zuerst wurde der Einfluss von HNF1B in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen auf die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren untersucht. Nach sieben Stunden konnte eine gesteigerte Expression von *lhx1*, *osr2* und *osr1* festgestellt werden, während die Expression von *pax8* und *hnf1b* im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen unverändert blieb (Tab. 6).

Tab. 6: Einfluss von HNF1B auf die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren, auf Gene der Nephrogenese (Lokmane et al., 2010; Ryffel, 2010) und auf Gene der proximalen Tubuli (Brunskill et al., 2008). Legende siehe nächste Seite.

	Gensymbol	x-fache Induktion	
		7h (N=5)	14h (N=4)
frühe nephrogenetische Transkriptionsfaktoren	lhx1	9,9 ↑	1,5
	osr2	4,3 ↑	2,2
	osr1	3,7 ↑	2,5
	pax8	2,4	1,7
	hnf1b	1,3	0,9
Gene der Nephrogenese	hnf1a	13,7 ↑	7,1
	wnt11b	4,6 ↑	1,3
	gdnf	1,2 ↑	1,4
	pax2	1,1	10,7 ↑
	wnt11	1,6	1,1
	wnt9b	0,8	0,7
Gene der proximalen Tubuli	hnf4a	22,9 ↑	3,4
	tfe3	1,8 ↑	1,2
	esd	1,0	1,3 ↑
	fgfr4c	0,7	0,5 ↓
	rbms1	1,0	0,2 ↓
	prodh2	95,9	1,7
	anxa13	5,3	1,4
	slc22a6	3,4	25,6
	cpn1	2,3	3,1
	tmem27	2,2	3,5
	slc5a2	1,9	2,3
	rpl35a	1,5	1,5
	gjb1	1,3	1,0
	trps1	1,2	0,8
	ube3a	1,1	0,8
	slc7a8	1,0	1,5
	fgfr4a	0,9	0,7
	c8a	0,9	1,1
	ncor1	0,9	1,1
	slc4a7	0,9	1,1

Tab. 6: Einfluss von HNF1B auf die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren, auf Gene der Nephrogenese (Lokmane et al., 2010; Ryffel, 2010) und auf Gene der proximalen Tubuli (Brunskill et al., 2008). Animale Kappen wurden im späten Blastulastadium 9 (Nieuwkoop und Faber, 1975) von HNF1B injizierten Embryonen geschnitten und für sieben bzw. 14 Stunden in Steinberg Lösung kultiviert. Danach wurde die mRNA-Expression mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt. In der Tabelle ist die x-fache Induktion der einzelnen mRNAs im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Eine Induktion oder Repression der Gene liegt vor, wenn für alle unabhängigen Experimente der Wert größer oder kleiner 1 war, und ist durch einen nach oben oder nach unten weisenden Pfeil und eine fett gedruckte Zahl gekennzeichnet. In den Gruppen stehen die Gene mit eindeutiger Induktion bzw. Repression zu Beginn der Auflistung. N ist die Anzahl der getesteten animalen Kappengruppen.

Die Analyse der Expression von Genen der Nephrogenese und der proximalen Tubuli in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen ergab die Induktion der Transkriptionsfaktoren *hnf1a*, *hnf4a* und *tfe3* sowie des Signalmoleküls *wnt11b* und des Wachstumsfaktors *gdnf* nach sieben Stunden (Tab. 6). Nach 14 Stunden waren der Transkriptionsfaktor *pax2* und die Esterase D (*esd*) induziert. Darüber hinaus konnte zu diesem späteren Zeitpunkt eine Herunterregulierung einiger Transkripte wie des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptors *fgfr4c* und des RNA Bindungsproteins *rbms1* festgestellt werden (Tab. 6). Diese verzögerte Reaktion auf HNF1B lässt sekundäre Effekte vermuten.

Da die mRNA-Expression von *lhx1* durch HNF1B induziert wurde, wurde außerdem die Expression der Transkripte von fünf *lhx1* Zielgenen analysiert. Tatsächlich wurden Cerberus (*cer1*) und Chordin (*chrd*) induziert, aber die drei anderen Faktoren nicht (Tab. 7). Goosecoid (*gsc*) zeigte sogar nach 14 Stunden eine starke Repression.

Tab. 7: Einfluss von HNF1B auf *lhx1* Zielgene. Im späten Blastulastadium 9 (Nieuwkoop und Faber, 1975) wurden animale Kappen von HNF1B injizierten Embryonen geschnitten, für sieben bzw. 14 in Steinberg Lösung kultiviert und anschließend die mRNA-Expression der *lhx1* Zielgene *chrd* (Agulnick et al., 1996), *cer1* (Yamamoto et al., 2003), *gsc* (Agulnick et al., 1996), *otx2* (Mochizuki et al., 2000) und *pcdh8.2* (Hukriede et al., 2003) mittels quantitativer realtime-PCR bestimmt. In der Tabelle ist die x-fache Induktion der einzelnen mRNAs im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen dargestellt. Eine eindeutige Induktion (Faktor > 1) bzw. Repression (Faktor <1) in allen getesteten Gruppen von animalen Kappen ist durch einen nach oben bzw. nach unten weisenden Pfeil und eine fett gedruckte Zahl angezeigt. N ist die Anzahl der getesteten animalen Kappengruppen.

Gensymbol	x-fache Induktion	
	7h (N=5)	14h (N=4)
cer1	421,3 ↑	2,9
chrd	9,0 ↑	7,8
gsc	3,5	0,1 ↓
pcdh8.2	5,1	2,0
otx2	1,3	1,3

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HNF1B in animalen Kappen, die embryonale Stammzellen darstellen, mehrere in der Nierenentwicklung involvierte Gene induzieren kann. Aber andere Gene, die als HNF1B Zielgene in Säugern bekannt sind, bleiben unbeeinflusst.

3.5 Identifikation einer funktionellen HNF1 Bindestelle in der Promotorregion von *lhx1*

3.5.1 Identifikation möglicher HNF1 Bindestellen in *lhx1*

Es ist bekannt, dass das *Xenopus* Gen *lhx1* während der frühen Embryogenese durch Aktivin A mittels eines Aktivin responsiven Elements (ARE, activin response element) im ersten Intron reguliert wird (Rebbert and Dawid, 1997; Watanabe et al., 2002). Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass HNF1B *lhx1* Transkripte in animalen Kappen induzieren kann (vergleiche Tab. 6), liegt die Vermutung nahe, dass *lhx1*

direkt von HNF1B induziert wird. Mittels *in silico* Analyse mit JASPAR (Portales-Casamar et al., 2010) konnten potentielle HNF1 Bindestellen in der Promotorregion und im ersten Intron des *Xenopus* *lhx1* Genes identifiziert werden (Abb.16).

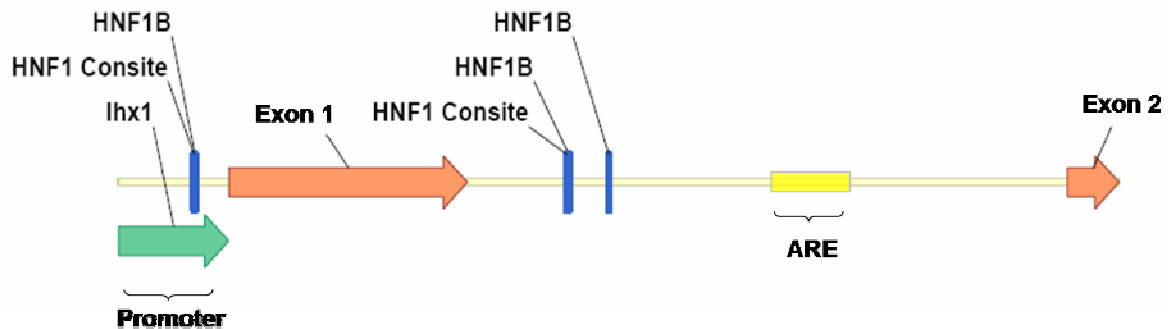


Abb.16: Identifikation möglicher HNF1 Bindestellen in der Promotorregion des *Xenopus* Genes *lhx1* mittels JASPAR (Portales-Casamar et al., 2010). In der schematischen Darstellung von *lhx1* ist die Promotorregion (grün), das erste Exon und Teile des zweiten Exons (orange) und das erste Intron (hellgelb) mit dem Aktivin responsiven Element (ARE) (gelb) mit möglichen HNF1 Bindestellen (blaue Balken) gezeigt. *HNF1B* repräsentiert mögliche Bindestellen auf dem Plus- und *HNF1 Consite* mögliche Bindestellen auf dem Minus-Strang.

Bei der Suche nach funktionellen HNF1 Bindestellen richtete sich das Augenmerk vor allem auf Bindestellen, bei denen es in unmittelbarer Nähe auf dem gegenüberliegenden Strang ebenfalls eine HNF1 Bindestelle gab, da HNF1B als Dimer an die DNA bindet (Mendel et al., 1991).

3.5.2 Aktivierung der *lhx1*-Reporterkonstrukte in HEK293 (HNF1B) Zellen

Um die funktionellen HNF1 Bindestellen zu ermitteln, wurden vier Luciferase-Reporterkonstrukte eingesetzt, die verschiedene Fragmente des *lhx1* Genes enthalten (Abb. 17A): Ex-5B, Ex-2:C, Ex-2:D und Ex-1:A (Rebbert and Dawid, 1997). Das Besondere an diesen Konstrukten ist, dass das Luciferase-Reporter-Gen direkt an den offenen Leserahmen des *lhx1*-Gens anschließt, wodurch ein *lhx1*-Luciferasefusionsprotein entsteht.

Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit dem Renilla-Luciferase Konstrukt pRL-Con in eine humane embryonale Nierenzelllinie transfiziert, in der die HNF1B Expression durch Tetracyclin bzw. Doxycyclin (Dox) induziert werden kann (HEK293

(HNF1B)) (Senkel et al., 2005). Um eine Induzierbarkeit der *lhx1*-Reporterkonstrukte durch HNF1B festzustellen, wurde die Änderung der Firefly-Luciferaseaktivität normalisiert zur Renilla-Luciferaseaktivität von induzierten (+Dox) zu nicht induzierten (-Dox) Zellen bestimmt. Da von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen werden kann, wurde der t-Test zur Bestimmung der Signifikanz eingesetzt.

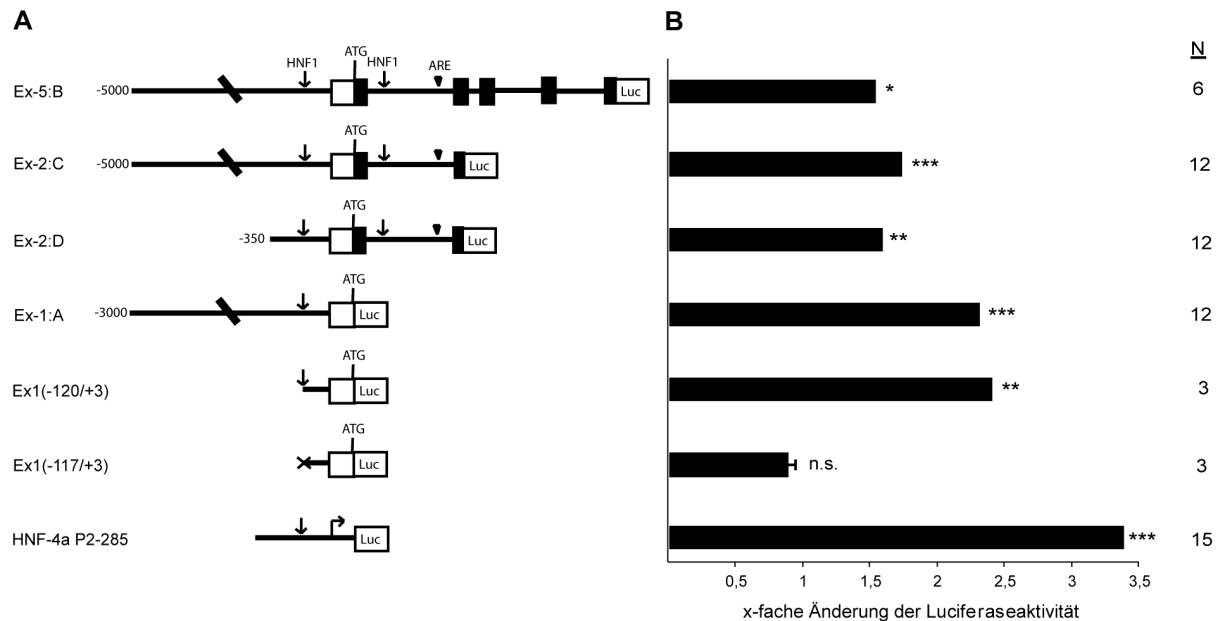


Abb.17: Die Luciferaseaktivität der *lhx1*-Reporterkonstrukte wird in HEK293 (HNF1B) Zellen durch HNF1B Expression induziert. In (A) sind die *lhx1*-Luciferase-Reporterkonstrukte schematisch dargestellt (nicht maßstabsgerecht). Die Linien stellen den Promotor und die Introns dar, während die Boxen proteinkodierende (schwarz) oder untranslatierte (weiß) Regionen repräsentieren (modifiziert nach Rebbert and Dawid, 1997). Pfeile kennzeichnen die potentiellen HNF1 Bindestellen, die mittels JASPAR (Portales-Casamar et al., 2010) identifiziert wurden. Die Pfeilspitze markiert das Aktivin responsive Element (ARE) in Intron I (Rebbert and Dawid, 1997). Das Konstrukt Ex1(-120/+3) enthält die komplette HNF1 Bindestelle in der Promotorregion von *lhx1*, während die Bindestelle in dem Konstrukt Ex1(-117/+3) teilweise zerstört ist (Details s. Abb.18). Das HNF-4a P2-285 Konstrukt enthält den P2-Promotor des HNF-4a Genes, welches durch HNF1B reguliert wird (Thomas et al., 2001; Wirsing et al., 2010), und dient als Positivkontrolle im Luciferase-Assay. Luc: Luciferase. (B) Die HEK293 (HNF1B) Zellen (Senkel et al., 2005) wurden mit den in (A) dargestellten *lhx1*-Luciferase-Reporterkonstrukten und dem Renilla-Luciferase Konstrukt pRL-Con als interne Kontrolle transfiziert und die x-fache Änderung der Firefly-Luciferaseaktivität normalisiert zur Renilla-Luciferaseaktivität von HNF1B exprimierenden Zellen (+Dox) zu nicht induzierten Zellen (-Dox) berechnet. Der t-Test wurde eingesetzt, um die Signifikanz zu bestimmen (n.s.: nicht signifikant, * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, *** p-Wert $\leq 0,001$). N ist die Anzahl der Dreifachbestimmungen von Zellpools.

Das Konstrukt Ex-5:B, welches das komplette *lhx1*-Gen enthält, ließ sich durch HNF1B induzieren (Abb. 17B). Durch die Analyse verschiedener Deletionskonstrukte (Ex-2:C, Ex-2:D und Ex-1:A), die alle durch HNF1B reguliert wurden (Abb. 17B), konnte eine potentielle HNF1 Bindestelle in der Promotorregion identifiziert werden. Um die Funktionalität dieser möglichen Bindestelle zu bestimmen, wurden zwei *lhx1*-Reporterkonstrukte hergestellt. Das Konstrukt Ex1(-120/+3) enthält die vollständige, aus zwölf Nukleotiden bestehende HNF1 Bindestelle, während in dem Konstrukt Ex1(-117/+3) die Bindestelle teilweise zerstört ist (Abb. 18). Beide Konstrukte wurden in HEK293 (HNF1B) Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Hierbei zeigte sich eine 2,5-fache Induktion der Luciferaseaktivität in Ex1(-120/+3), welche ungefähr 70% der Aktivierung des Kontrollkonstruktes HNF-4a P2-285 entspricht (Abb. 17B). Dagegen konnte für das Konstrukt Ex1(-117/+3) mit der zerstörten HNF1 Bindestelle keine Luciferaseaktivität festgestellt werden. Dies zeigt deutlich, dass die partielle Mutation von drei von zwölf Basenpaaren der HNF1 Bindestelle im *lhx1* Promotor ausreicht, um eine Regulation durch HNF1B zu verhindern.

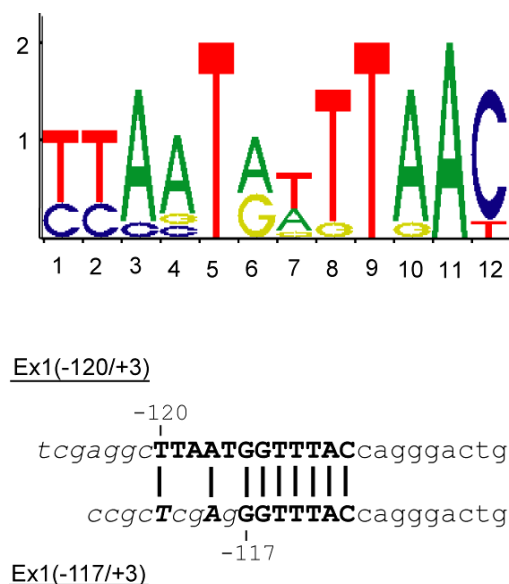


Abb.18: Die obere Abbildung stellt das in JASPAR angegebene Sequenzlogo der HNF1 Bindestelle dar (Portales-Casamar et al., 2010). Im unteren Bereich ist ein kurzer Sequenzausschnitt der intakten (Ex1(-120/+3)) bzw. mutierten (Ex1(-117/+3)) HNF1 Bindestelle (fette Großbuchstaben) der jeweiligen Konstrukte gezeigt. Die Vektorsequenz ist kursiv geschrieben.

3.5.3 Aktivierung der *lhx1*-Reporterkonstrukte in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen

Um diese Ergebnisse auch in embryonalen Zellen von *Xenopus laevis* zu bestätigen, wurden einige der *lhx1*-Reporterkonstrukte in animalen Kappen getestet. Hierzu wurden die jeweiligen Konstrukte (50pg) zusammen mit dem Renilla-Luciferase-Kontrollkonstrukt pRL-Con entweder allein oder zusammen mit HNF1B mRNA (150pg) in beide Blastomere des Zweizellstadiums von *Xenopus* Embryonen injiziert, in der späten Blastula die animalen Kappen geschnitten und die Luciferaseaktivität nach vier Stunden Inkubation in Steinberg Lösung mittels Luciferase-Assay analysiert.

Um die Aktivierung der einzelnen Reporterkonstrukte in HNF1B überexprimierenden und unbehandelten animalen Kappen zu vergleichen, wurden die Verhältnisse der Firefly- zur Renilla-Luciferaseaktivität in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Da die Luciferaseaktivitäten der einzelnen getesteten Gruppen von vier animalen Kappen stark voneinander abwichen, die Stichprobengröße klein war und die Stichproben unabhängig voneinander waren, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test zur Bestimmung der Signifikanz eingesetzt.

Alle Konstrukte, die eine HNF1 Bindestelle enthalten, wurden durch das injizierte HNF1B transaktiviert (Abb. 19). Auch für das minimale Konstrukt Ex1(-120/+3) wurde eine signifikant gesteigerte Luciferaseaktivität durch das injizierte HNF1B festgestellt, während das Reporterkonstrukt mit der teilweise zerstörten HNF1 Bindestelle, Ex1(-117/+3), nicht mehr induzierbar war.

Abb.19: Die Luciferaseaktivität der *lhx1*-Reporterkonstrukte wird in animalen Kappen durch HNF1B Expression induziert. Die *lhx1*-Reporterkonstrukte (50pg) wurden in HNF1B überexprimierenden (150pg) und unbehandelten animalen Kappen getestet. Die Luciferaseaktivität wurde nach vier Stunden Inkubation in Steinberg Lösung in Gruppen von vier animalen Kappen getestet. Um eine gesteigerte Luciferaseaktivität zu bestimmen, wurde das Verhältnis der Firefly-Luciferase (FL) zur Renilla-Luciferase (RL) berechnet. Zur Bestimmung der Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-Test eingesetzt (n.s.: nicht signifikant; * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$). Die vertikale Linie in der Mitte stellt den Mittelwert des FL/RL-Verhältnisses und die kleineren Linien die Standardabweichung zu beiden Seiten dar. N ist die Anzahl der getesteten animalen Kappengruppen.

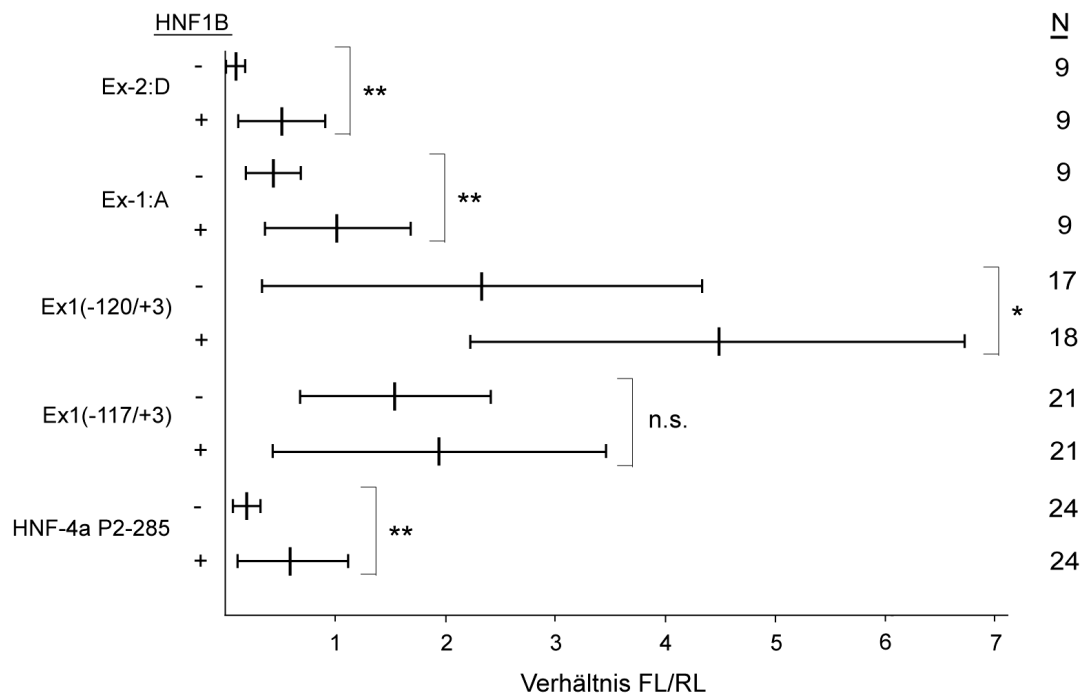


Abb.19: Die Luciferaseaktivität der Ihx1-Reporterkonstrukte wird in animalen Kappen durch HNF1B Expression induziert. Legende siehe vorherige Seite.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Ihx1 Promotor eine funktionelle HNF1 Bindestelle enthält, die sowohl in HEK293 Zellen als auch in embryonalen Zellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* aktiv ist.

4 Diskussion

4.1 Das animale Kappen-Testsystem

Animale Kappen des frühen Blastulastadiums von *Xenopus laevis* stellen ein geeignetes System zur *in vitro* Analyse der Nephrogenese dar, da die Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen durch Behandlung mit Aktivin A und Retinsäure induziert werden kann (Moriya et al., 1993).

Aktivin A simuliert als Mitglied der TGF-beta Familie den vegetalisierenden Faktor 1 (vg1), dessen maternale mRNA im vegetativen Pol von *Xenopus* Eiern lokalisiert ist (Rebagliati et al., 1985; Weeks and Melton, 1987). Vg1 ist ein Mesoderminduktor und ein essentieller Regulator in der Embryonalentwicklung (Birsoy et al., 2006). Retinsäure, ein Vitamin A Derivat, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im embryonalen Wachstum und der Embryostrukturierung (Niederreither and Dolle, 2008). Während der embryonalen Entwicklung wird die Verfügbarkeit von Retinsäure in verschiedenen Geweben und Zellen durch synthetisierende und metabolisierende Enzyme reguliert (Niederreither and Dolle, 2008). Im ersten Schritt der Retinsäuresynthese wandeln Alkoholdehydrogenasen (ADHs) und Retinoldehydrogenasen (RDHs) das Vitamin A (Retinol) in Retinaldehyd um. Die anschließende Oxidation des Retinals zu Retinsäure wird durch Retinaldehydrogenasen (RALDHs) vermittelt. Die Degradation der Retinsäure durch Oxidation erfolgt mittels Cytochrom P450 (CYP) Enzyme (Duester, 2008). In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass die Retinaldehydrogenase (RALDH2) einen kritischen Retinsäure-Gradienten entlang der anteroposterioren Achse erzeugt, welcher wichtig für die exakte Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) ist (Chen et al., 2001). Auch in der Nierenentwicklung ist Retinsäure von besonderer Bedeutung. Die Lokalisation von Enzymen, die eine Rolle in der Synthese von Retinsäure spielen, wurde auch in der Pronephrosanlage und in Pronephrosstrukturen gefunden (Ang and Duester, 1999; Chen et al., 2001). Wird der Retinsäure-Signalweg in *Xenopus* Embryonen gestört, so hat dies eine gehemmte Pronephrosentwicklung zur Folge (Cartry et al., 2006). Die Behandlung von Embryonen mit Retinsäure dagegen führt zu einer Pronephrosvergrößerung (Taira et al., 1994a). Des Weiteren ist Retinsäure wichtig für die Expression der nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *lhx1* und *pax8* (Cartry et al., 2006). Ebenfalls konnte die kritische Rolle von Retinsäure in der Nierenentwicklung in Mäusen gezeigt werden (Batourina et al., 2001).

Animale Kappen bestehen aus pluripotenten Zellen, die mit verschiedenen Faktoren dazu angeregt werden können, in unterschiedliche Gewebe zu differenzieren (Okabayashi and Asashima, 2003; Asashima et al., 2009). Damit sind sie vergleichbar mit embryonalen Stammzellen (ES) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS), welche immer häufiger als Modellsysteme für das Verständnis entwicklungsbiologischer Mechanismen eingesetzt werden. Aus ES-Zellen können sich die verschiedensten funktionellen Zelltypen wie z.B. Nervenzellen, hämatopoetische Zellen, pankreatische beta-Zellen oder Herzmuskelzellen entwickeln (Murry and Keller, 2008). Trotz des großen Differenzierungspotentials konnte bisher kein optimales Protokoll für die *in vitro* Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu einer renalen Zelllinie entwickelt werden. Viele Stammzellforscher haben die Methode der Pronephrosinduktion in animalen Kappen mit Aktivin A und Retinsäure auf verschiedenste Weisen und in Kombination mit anderen Faktoren auf Differenzierungsexperimente von Maus-ES-Zellen zu renalen Zelllinien übertragen (Osafune, 2010). So führt z.B. die Behandlung von Maus-ES-Zellen mit einer Kombination aus Aktivin A, Retinsäure und Bmp7 zur Expression von Markern des intermediären Mesoderms. Werden diese Zellen in die Nierenanlage eingebracht, so differenzieren sie zu Tubulusepithelzellen (Kim and Dressler, 2005). Allerdings befindet sich die Forschung der Nierenregeneration aus ES-Zellen noch in den Anfängen. Die Induktionseffizienz vieler dieser Methoden ist relativ gering, und oft entsteht eine heterogene Mischung von Zellen. Des Weiteren muss untersucht werden, inwieweit die renalen Zellen aus differenzierten ES-Zellen als Niere funktionieren können. Animale Kappen stellen somit bisher das einzige System dar, in dem *in vitro* ein funktionaler Pronephros induziert werden kann (Chan et al., 1999). Auch wenn der animale Kappen-Test eine sehr gute Methode für die Analyse der Signalwege in der Nephrogenese ist, zeigten sich doch einige Einschränkungen dieses Systems. In keinem der Versuche konnten alle mit Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen zur Pronephrosdifferenzierung induziert werden. Die Induktionsrate lag zwischen 52% und 85% in den einzelnen Versuchen und ist vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen Induktion von 80% (Moriya et al., 1993; Osafune et al., 2002). Die teilweise geringe Induktionsrate von nur knapp über 50% in einigen Versuchen könnte durch Unterschiede in der Schneidetechnik, den eingesetzten Tieren und der damit verbundenen Qualität der Eier erklärt werden. Zusätzlich starben viele animale Kappen oft während der vier Tage Inkubation in

Steinberg Lösung. Wurden die Explantate von mRNA injizierten Embryonen genommen, so erhöhte sich die Sterblichkeitsrate am ersten Tag nach dem Schneiden erheblich. Diese Letalität erschwerte es, eine ausreichende Anzahl an animalen Kappen für die weitere Analyse zu erhalten. Dennoch konnte eine klare Induktion der Pronephrosdifferenzierung in mit Aktivin A und Retinsäure behandelten Explantaten festgestellt werden (s. Abb. 4B und 5).

Die inhomogene Reaktion individueller animaler Kappen in der Immunhistofärbung zeigte sich auch bei der Analyse der Induktion spezifischer Transkripte mittels realtime-PCR, die erheblich von Experiment zu Experiment schwankte (s. Abb. 6 und 9). Wurden animale Kappen von mRNA injizierten Embryonen analysiert, so verstärkte sich dieser Effekt noch (s. Abb. 12 und 15). Dies lässt sich damit erklären, dass in Injektionsexperimenten die Menge der injizierten mRNA von einem Tier zum nächsten variieren kann. Des Weiteren kann die Injektion nicht sehr präzise in definierte Regionen des animalen Pols erfolgen. Je nach Ort der Injektion kann es so zu unterschiedlichen Reaktionen der animalen Kappen auf die injizierte mRNA kommen. Diese starken experimentellen Schwankungen konnten ebenfalls in der Transaktivierung der Promotor-Luciferase-Konstrukte beobachtet werden (s. Abb. 19) und wurden bereits in der Literatur beschrieben (Weber et al., 1996; Rebbert and Dawid, 1997). In den Luciferase-Assays in animalen Kappen wurden die Schwankungen wahrscheinlich noch durch die ungleiche Verteilung der Promotorkonstrukte und der HNF1B mRNA in den sich entwickelnden Embryonen potenziert. Um die Schwankungen der injizierten Menge von Embryo zu Embryo einzudämmen, könnte ein neuerer Injektor eingesetzt werden, der z.B. die Piezotechnik nutzt, mit der exakte Volumina injiziert werden können.

Trotz dieser technischen Probleme konnten die animalen Kappen erfolgreich eingesetzt werden, um die Signalwege der Nephrogenese in differenzierenden animalen Kappen zu analysieren.

4.2 Statistische Beurteilung der Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in animalen Kappen

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand aus der Ermittlung der Expressionsinduktion von Faktoren in animalen Kappen mittels quantitativer realtime-PCR. Diese Methode bietet eine eindeutigere Aussage als die bisher von anderen Forschungsgruppen eingesetzten semiquantitativen PCRs (Chan et al., 2000) oder RNA-Blots (Taira et al., 1992), bei denen auf einem Gel die Bandenstärken einzelner Faktoren verglichen und meist keine Aussagen zur Reproduzierbarkeit getroffen wurden. Bei der Auswertung der realtime-PCR wurden allerdings starke Schwankungen der Werte von Experiment zu Experiment beobachtet (s. 4.1).

Da Gruppen von insgesamt 30 animalen Kappen untersucht wurden, die zwar vom gleichen Frosch stammten, aber bedingt durch die Schneidetechnik und evtl. Injektionen nicht völlig identisch in Größe und Beeinflussung durch andere Faktoren waren, wurden unabhängige Stichproben angenommen. Aufgrund der geringen Anzahl an analysierten Gruppen (N=4 bzw. 5) konnte nicht getestet werden, ob eine Normalverteilung der Werte vorlag. Um eine statistische Auswertung vornehmen zu können, müsste ein nicht-parametrischer Test eingesetzt werden. Bei der sehr geringen Anzahl an Stichproben ist allerdings eine statistische Auswertung nicht sehr sinnvoll, da je nach angewandtem nicht-parametrischen Test im bestmöglichen Fall nur ein p-Wert knapp unter 0,05 und nicht wesentlich kleiner erreicht und somit keine signifikante Aussage getroffen werden kann (persönliches Gespräch mit Frau Dr. rer. medic. Tanja Boes, IMIBE, Uniklinikum Essen). Daher wurden zur Einschätzung der Expressionsänderung bestimmter Faktoren Transkripte als induziert bzw. reprimiert betrachtet, wenn in allen getesteten Gruppen von animalen Kappen die relative Quantität größer als eins bzw. kleiner als eins war. Um die hier getroffenen Aussagen zur Expression einzelner Faktoren zu bestätigen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, um eine ausreichende Anzahl an Werten zu bekommen, und anschließend eine statistische Analyse vorgenommen werden. Dies wäre aber aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate der animalen Kappen mit einem erheblichen zeitlichen und experimentellen Aufwand verbunden.

4.3 Die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren werden durch Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert

Zusätzlich zu der bereits bekannten Induktion von *lhx1* (Taira et al., 1992) und *pax8* (Heller and Brändli, 1999) konnte in dieser Arbeit die Induktion von *osr1*, *osr2* und *hnf1b* (s. Abb. 6) in mit Aktivin A und Retinsäure behandelten Kappen gezeigt werden (zusammengefasst in Abb. 20). Dabei reflektiert die Induktionskinetik der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in den animalen Kappen ihre Expression *in vivo*. Diese Beobachtung wurde bereits für die Induktion anderer RNAs gemacht (Uochi and Asashima, 1996; Brennan et al., 1999; Osafune et al., 2002).

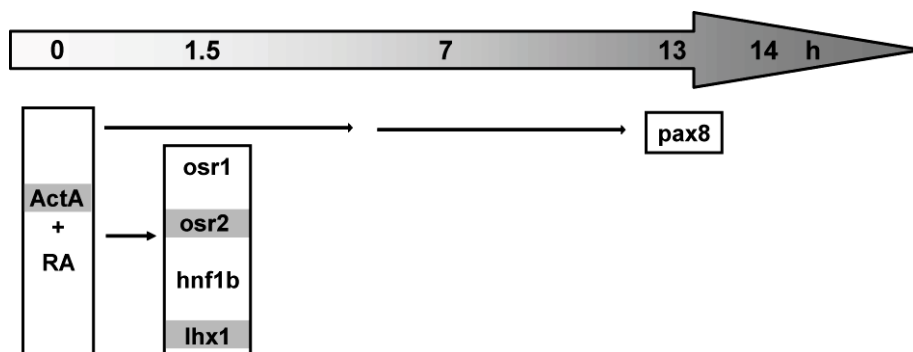


Abb. 20: Induktion der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in Aktivin A und/oder Retinsäure behandelten animalen Kappen. *Osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1* werden bereits nach 1,5 Stunden, *pax8* erst nach 13 Stunden in mit Aktivin A (ActA) und Retinsäure (RA) behandelten animalen Kappen induziert. *Osr2* und *lhx1* (grau hinterlegt) werden von Aktivin A allein nach drei Stunden induziert, während Retinsäure allein keinen der Faktoren induziert.

Die frühe Expression von *osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1* nach 1,5 Stunden entspricht ihrer embryonalen Expression in der frühen Gastrula (Taira et al., 1992; Demartis et al., 1994; Tena et al., 2007). Die Expression von *hnf1b* und *lhx1* in animalen Kappen hat ihr Maximum nach sieben Stunden erreicht und fällt dann wieder ab, ist aber im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen immer noch erhöht. Dies lässt auf eine transiente Aktivierung von *hnf1b* durch Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen schließen, wie sie bereits für *lhx1* beschrieben wurde (Taira et al., 1992). Im Gegensatz zu den anderen vier Faktoren wird *pax8* erst später in den animalen Kappen exprimiert und ist damit vergleichbar mit der *pax8* Expression in der späten

Gastrula *in vivo* (Carroll and Vize, 1999). Diese verzögerte Expression nach 13 Stunden in animalen Kappen lässt eine indirekte Induktion von pax8 durch andere induzierte Faktoren vermuten.

Die Induktion von *osr2* und *lhx1* in Aktivin A behandelten animalen Kappen (s. Abb. 9 und zusammengefasst in Abb. 20) zeigt die starke Induktor-Aktivität von Aktivin A (Asashima et al., 1999). Im Gegensatz dazu kann Retinsäure allein nach drei Stunden Inkubation keinen der fünf nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren induzieren (s. Abb. 9). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass Retinsäure allein keine Bildung von Pronephrosstrukturen in animalen Kappen induzieren kann (Chan et al., 1999; Ariizumi and Asashima, 2001; Okabayashi and Asashima, 2003). Allerdings wurde in früheren Versuchen beschrieben, dass eine schwache Induktion von *lhx1* in animalen Kappen durch Retinsäurebehandlung erzielt werden kann (Taira et al., 1992; Chan et al., 2000). Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich vermutlich durch feine Unterschiede im Induktionsprotokoll oder auch der eingesetzten Tiere erklären. Taira et al. (1992) konnten nach drei Stunden eine sehr schwache Induktion von *lhx1* feststellen, die mit einer verlängerten Inkubationszeit in Retinsäure verstärkt werden konnte. Diese Induktion war aber ebenso wie bei der Behandlung mit Aktivin A allein oder in Kombination mit Retinsäure nur transient. Dass Taira et al. (1992) nach drei Stunden Inkubation in Retinsäure eine schwache *lhx1* Induktion feststellen konnten, die in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde, könnte damit erklärt werden, dass nach ca. drei Stunden gerade die Induktion von *lhx1* durch Retinsäure einsetzt. Evtl. wurden die animalen Kappen in dieser Arbeit etwas früher analysiert als die von Taira et al. (1992), so dass noch keine Induktion detektiert werden konnte. Um dies genauer zu analysieren, müssten animale Kappen länger in Retinsäure inkubiert und die *lhx1* Induktion nach drei Stunden in kürzeren Abständen von ca. 15min untersucht werden. Konsistent mit der hier beschriebenen Beobachtung, dass Retinsäure nach drei Stunden *lhx1* nicht induzieren kann, sind die Ergebnisse von Chan et al. (2000). Chan und Kollegen inkubierten die animalen Kappen ebenso wie in dieser Arbeit für drei Stunden in Retinsäure und konnten eine erste *lhx1* Induktion erst nach weiteren zwölf Stunden feststellen.

Es wurde spekuliert, dass die Induktion von *lhx1* durch Aktivin A allein seiner Expression im dorsalen Mesoderm und Notochord entspricht, während die Induktion durch Kombination mit Retinsäure in der Expression in der Pronephrosregion und

dem Neuroektoderm resultiert (Taira et al., 1994a). Das kann darauf hindeuten, dass Retinsäure in animalen Kappen die *lhx1* Induktion durch Aktivin A modifiziert und Richtung Pronephrosdifferenzierung lenkt. Experimente mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid zeigen allerdings, dass die *lhx1* Expression bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cycloheximid nicht durch Retinsäure induziert werden kann, woraus folgt, dass *lhx1* nicht direkt durch Retinsäure aktiviert wird (Tadano et al., 1993). Dies würde bedeuten, dass die Modifizierung der *lhx1* Induktion durch Aktivin A nicht direkt durch Retinsäure, sondern durch Retinsäure induzierte Gene erfolgen muss. Anzumerken bleibt auch, dass die Retinsäurebehandlung von animalen Kappen keine physiologischen Bedingungen widerspiegelt. In der *Xenopus* Embryogenese ist die Gesamtkonzentration an Retinsäure ($0,92 \times 10^{-7} \text{M}$; Blumberg, 1997) wesentlich geringer als im animalen Kappen-Test (10^{-4}M). Diese erheblich höhere Retinsäurekonzentration befindet sich allerdings außerhalb der animalen Kappe, und es ist nicht bekannt, wie viel der Retinsäure aus der Induktionslösung in die animale Kappe gelangt. Des Weiteren ist es ebenfalls möglich, dass im Embryo lokale Konzentrationen höher sind.

Widersprüchlich zu dem hier gezeigten Ergebnis, dass *hnf1b* nur durch Aktivin A und Retinsäure gemeinsam induziert werden kann, ist die beschriebene Induktion von *hnf1b* durch Aktivin A allein (Hudson et al., 1997). Diese Beobachtung konnte auch in mehreren Versuchen, in denen Primer eingesetzt wurden, die die gleiche Region der *hnf1b* Transkripte wie in Hudson et al. (1997) amplifizieren, nicht bestätigt werden. Direkt vergleichbar sind die Versuche aber nicht miteinander, da Hudson und Kollegen die animalen Kappen insgesamt zwei Stunden länger, also statt drei fünf Stunden, in Aktivin A inkubiert und anschließend analysiert haben. In Anbetracht dieses Ergebnisses kann angenommen werden, dass *hnf1b* nicht direkt durch Aktivin A sondern durch zwischengeschaltete Faktoren induziert wird. Dazu könnte die *hnf1b* Induktion in Aktivin A aktivierten animalen Kappen in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid analysiert werden. Wird *hnf1b* trotz Cycloheximid nach fünf Stunden induziert, so ist *hnf1b* ein direktes Zielgen von Aktivin A.

Die frühe Induktion von *osr2* und *lhx1* durch Aktivin A lässt vermuten, dass diese beiden Gene direkt durch Aktivin A aktiviert werden. Für *lhx1* wurde dies bereits näher untersucht. So wird eine *lhx1* Induktion auch in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid beobachtet, wodurch eine indirekte

Aktivierung ausgeschlossen werden kann (Taira et al., 1992; Tadano et al., 1993). Des Weiteren konnte die direkte Aktivierung von *lhx1* durch die Identifikation eines Aktivin responsiven Elements (ARE) im *lhx1* Promotor bestätigt werden (Rebbert and Dawid, 1997; Watanabe et al., 2002). Interessant wäre zu untersuchen, ob *osr2* ebenfalls direkt durch Aktivin A aktiviert wird und auch ein Aktivin responsives Element (ARE) besitzt.

4.4 Wichtige Faktoren der Mesodermentwicklung und der Nephrogenese werden in animalen Kappen induziert

Die Analyse Aktivin A und Retinsäure induzierter animaler Kappen nach 1,5 Stunden mittels Mikroarray (s. 3.2.3) ergab die Induktion vieler Faktoren, von denen bereits bekannt ist, dass sie von Aktivin A reguliert werden. Die Expression aller vier *bix* Homeoboxfaktoren (s. Tab. 4) wird durch Aktivin A induziert (Tada et al., 1998). Für *bix1.1* wurde außerdem gezeigt, dass seine Induktion durch Aktivin A durch den Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid nicht gehemmt wird, also eine direkte Induktion vorliegt (Tada et al., 1998). Ebenfalls eine direkte Aktivierung durch Aktivin A bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cycloheximid konnte für die Homeobox-Transkriptionsfaktoren *mix1* (Rosa, 1989; Gurdon et al., 1996) und *not* (von Dassow G. et al., 1993) und das Signalmolekül *lefty* (Xatv; Tanegashima et al., 2000) gezeigt werden (s. Tab. 4 und 5). Der Transkriptionsfaktor *eomes* (s. Tab. 4) wird ebenfalls von Aktivin A aktiviert (Gurdon et al., 1996) und besitzt ein Aktivin responsives Element (ARE) im Promotor (Ryan et al., 2000). Des Weiteren ist auch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *mixer* (Henry and Melton, 1998) und *sox17b.1* (Hudson et al., 1997) und der Hyaluronansynthase *has2* (Ori et al., 2006) durch Aktivin A bekannt (s. Tab. 4 und 5). Das Homeoboxprotein *hoxd1* (s. Tab. 4) wird sowohl von Retinsäure (Sive and Cheng, 1991) als auch auf einem geringen Level von Aktivin A (Kolm and Sive, 1995) aktiviert.

Interessant ist die Induktion von Faktoren der Apoptose (s. Tab. 5). Dazu gehören die Apoptose einleitenden Faktoren *cidea* (Inohara et al., 1998), *gadd45g* (Takekawa and Saito, 1998) und *plk3* (Xie et al., 2001) sowie die antiapoptotischen Faktoren *sgk1* (Belova et al., 2006) und *rhov* (Uddin and Singh, 2006). Da die Apoptose während der Entwicklung eine essentielle Rolle spielt (Meier et al., 2000), deutet das

Auftreten dieser Faktoren darauf hin, dass entwicklungsbiologische Prozesse eingeleitet werden.

Des Weiteren sind viele Faktoren der Mesodermentwicklung induziert. Zu den Mesoderminduktoren gehören die Transkriptionsfaktoren *eomes* (Ryan et al., 1996) und *vegt* (Kavka and Green, 2000) (s. Tab. 4) sowie die Signalmoleküle *lefty* (Cha et al., 2006), *fgf8* (Fletcher et al., 2006), *nodal1* und *nodal2* (Jones et al., 1995; Takenaga et al., 2007) (s. Tab. 5). Die Induktion von Faktoren der Mesodermentwicklung war zu erwarten, da die animalen Kappen aus ektodermalen Zellen bestehen, der Pronephros sich aber aus Mesoderm entwickelt. Um also eine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen zu erzielen, muss als erstes Mesoderm gebildet werden. Allerdings werden auch die Mesoderminhibitoren *not*, *Xnot2* (Yasuo and Lemaire, 2001) und *mixer* (Kofron et al., 2004) induziert (s. Tab. 5). Die Induktion dieser Faktoren hat aber vermutlich keine Bedeutung für die Mesodermentwicklung in animalen Kappen, sondern lässt sich für *not* und *Xnot2* darauf zurückführen, dass Aktivin A in hohen Konzentrationen (50ng/ml) in animalen Kappen Notochord induzieren kann (Ariizumi et al., 1991). Trotz einer hier eingesetzten geringeren Aktivin A Konzentration von 10ng/ml in Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen ist es möglich, dass bereits Faktoren der Notochordentwicklung wie *not* und *Xnot2* induziert werden. Ebenso ist *mixer* nicht nur ein Mesoderminhibitor, sondern spielt außerdem eine indirekte Rolle in der Nierenentwicklung (s.u.).

Schon bereits nach 1,5 Stunden sind die Faktoren *mix1*, *mixer* (s. Tab. 4), *fgf8* und *wnt11b* (s. Tab. 5) induziert, die eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung spielen. In der Gastrula reguliert *mix1* die Expression von *fgf3*, *fgf4* und *fgf8* während der Pronephrosdifferenzierung (Colas et al., 2008). Colas et al. (2008) konnten zeigen, dass die Expression von *mix1* zu Beginn der Pronephrosdifferenzierung die Konzentration von FGF herunterreguliert und somit die Pronephrosentwicklung erfolgen kann. Eine erhöhte FGF-Konzentration in der Gastrula dagegen hemmt die Bildung der Pronephrosvorläuferzellen. *Mixer* hemmt ebenfalls die *fgf8* Expression und begünstigt damit die Pronephrosentwicklung (Kofron et al., 2004). Für das ebenfalls induzierte Signalmolekül *wnt11b* konnte in Holtfreter-Sandwich-Kulturen gezeigt werden, dass es unspezifiziertes intermediäres Mesoderm zur Pronephrosdifferenzierung induzieren kann und somit ein wichtiges Signal in der

Nierenentwicklung darstellt (Tételin and Jones, 2010). Die Verknüpfung dieser vier Faktoren am Anfang der Pronephrosdifferenzierung ist in Abbildung 21 gezeigt.

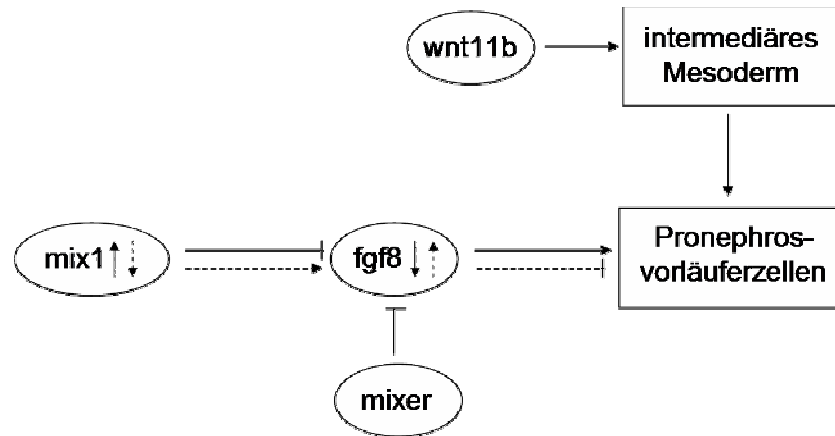


Abb. 21: Model der Verknüpfung von mix1, mixer, fgf8 und wnt11b in der frühen Pronephrosentwicklung. Mix1 und mixer hemmen die fgf8 Expression und begünstigen damit die Bildung von Pronephrosvorläuferzellen. Bei einer geringen mix1-Konzentration dagegen, ist die FGF-Konzentration erhöht und die Pronephrosentwicklung gehemmt (gestrichelte Linien). Wnt11b induziert im intermediären Mesoderm die Pronephrosdifferenzierung.

Zu Beginn der Pronephrosmorphogenese (Stadium 20/21) ist allerdings die Expression von fgf8 wichtig für die epithelial-mesenchymale Transition in der Tubuli-Entwicklung (Urban et al., 2006), während die Expression von mix1 und mixer herunterreguliert ist (Rosa, 1989; Henry and Melton, 1998). Zu diesem Zeitpunkt ist auch der in den animalen Kappen induzierte Faktor dll1 (s. Tab. 5) in die Nierenentwicklung involviert (delta-1; Brändli, 1999).

Interessant ist darüber hinaus die Induktion von sox17b.1 (s. Tab. 4). In sox17b.1 injizierten animalen Kappen ist die Expression von hnf1b induziert (Hudson et al., 1997; Sinner et al., 2006), während in sox17b.1-Morpholino injizierten Embryos hnf1b herunterreguliert ist (Sinner et al., 2006). Diese Regulation von hnf1b durch sox17b.1 erfolgt direkt, wie Experimente mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid gezeigt haben (Clements et al., 2003). Die frühe Induktion von sox17b.1 in Aktivin A und Retinsäure aktivierten animalen Kappen deutet darauf hin,

dass die Expression des frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktors *hnf1b* durch *sox17b.1* induziert oder aber auch verstärkt wird.

Insgesamt zeigt die Mikroarrayanalyse bereits nach 1,5 Stunden die Induktion einiger Faktoren, die die Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen einleiten.

Faktoren, die in den mit Aktivin A und Retinsäure induzierten animalen Kappen um einen Faktor kleiner als 1,5 induziert waren (s. Tab. 8 im Anhang), wurden nicht weiter analysiert, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese geringe Veränderung der Genexpression durch zwei oder mehr animale Kappen aus der Gruppe von 30 analysierten animalen Kappen verursacht wird, die sich evtl. nicht induzieren ließen (s. 4.1). Um die weniger stark induzierten Faktoren dennoch mit in die Analyse einbeziehen zu können, da auch schon geringe Expressionsänderungen einen Einfluss auf entwicklungsbiologische Prozesse haben können, müssten die geringen Unterschiede in der Genexpression durch zusätzliche Experimente wie realtime-PCR-Analysen bestätigt werden.

Bei der Auswertung der Mikroarrays zeigten sich allerdings einige Unstimmigkeiten (s. Tab. 4, 5 und Anhang Tab. 8). So waren viele der Probesets von induzierten Faktoren nicht bei Xenbase (Bowes et al., 2010) gelistet und mussten über die UniGene-Nummer (Unigene, 2010) oder die „Target Sequence“, die bei Affymetrix in der „Probe Design Information“ angegeben sind, identifiziert werden. Dabei stellte sich bei einigen Probesets heraus, dass diese nicht komplementär zu einer *Xenopus* Sequenz waren oder statt *Xenopus laevis* *Xenopus tropicalis* Transkripte detektierten. Oft waren die identifizierten Gene nur teilweise komplementär zu den Probesets. Ein Probeset war sogar falsch benannt: Xl.4621.1.A1_at soll laut Affymetrix *rac2* detektieren. Sucht man aber mit dieser Probeset-Nummer bei Xenbase (Bowes et al., 2010) und mit der angegebenen Sequenz in NCBI nach dem zu detektierenden Gen, so sind die Sonden (probes) komplementär zu *rhov*. Des Weiteren gibt es für viele der induzierten Gene bisher nur provisorische Gensymbole/-namen, die sich oft von den humanen Genen ableiten. All diese Unstimmigkeiten lassen sich darauf zurückführen, dass das *Xenopus laevis* Genom bisher nur teilweise entschlüsselt ist und es in *Xenopus laevis* Genduplikationen gibt, die noch nicht alle bekannt sind. Dies macht es schwer, Probesets genau zu definieren. Auch die sich ständig verändernde Datenlage durch neu sequenzierte

Gene führt dazu, dass viele Probesets auf dem Mikroarray falsch oder unzureichend (Lokus oder hypothetisches Protein) benannt sind.

Viele dieser Unstimmigkeiten finden sich ebenfalls auf der neuen Version des Mikroarrays (GeneChip® *Xenopus laevis* Genome 2.0 Array), so dass sich auch dieser Mikroarray nicht gut für die Identifizierung weiterer wichtiger Faktoren in der Nephrogenese eignet und so dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

4.5 Die Überexpression von OSR1 und Osr2A zeigt einen vergleichbaren Effekt auf die Pronephrosentwicklung

In Säugern und auch in *Xenopus* enthalten *osr1* und *osr2B* drei Zinkfinger, während *osr2A* fünf Zinkfinger besitzt. Kawai et al. (2005) konnten in der Maus zeigen, dass die beiden Splicevarianten *Osr2A* und *Osr2B*, wenn sie mit der Gal4 DNA-Bindungsdomäne fusioniert waren, in Zellkulturtests gegensätzliche transkriptionale Aktivitäten zeigten. Das lässt vermuten, dass die Splicevarianten aufgrund ihrer unterschiedlichen Anzahl an Zinkfingern eine unterschiedliche Funktion haben. In *Xenopus* zeigte sich für *osr1* und *osr2B* mit jeweils drei Zinkfingern, dass beide Faktoren einen vergleichbaren Einfluss auf die Pronephrosentwicklung haben (Tena et al., 2007). Der Faktor *osr2A* wurde von Tena et al. (2007) nicht getestet. Da *osr2A* fünf Zinkfinger besitzt, lag die Vermutung nahe, dass es in *Xenopus* die Nierenentwicklung anders als *osr1* beeinflusst. Die Überexpression des humanen OSR1, welches drei Zinkfinger enthält (Katoh, 2002), und des *Osr2A* der Maus mit fünf Zinkfingern (Kawai et al., 2005) zeigte einen entsprechenden Einfluss auf die Pronephrosentwicklung wie die der *Xenopus* Homologe. Beide Faktoren führten zu einer Vergrößerung des Pronephros (s. Abb. 11). Das deutet auf eine vergleichbare Funktionalität der beiden Faktoren hin.

Da beide Splicevarianten von *osr2* einen zu *osr1* vergleichbaren Einfluss auf die Nierenentwicklung zeigten, wurde in den Versuchen, die die Induktion der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen durch Überexpression der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren untersuchen, das humane OSR1 eingesetzt.

4.6 OSR1, LHX1 und/oder Pax8 und HNF1B können keine Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen induzieren

In vielen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass eine spezifische Gewebeinduktion in animalen Kappen durch die Überexpression von Transkriptionsfaktoren erzielt werden kann. Die Überexpression von Xbra z.B. führt zur Mesoderm-differenzierung mit der Ausbildung von Muskeln, Mesoepithel und Mesenchym (Cunliffe and Smith, 1992; Tada et al., 1997), wohingegen das überexprimierte Mix der Maus (Mohn et al., 2003) ebenso wie GATA4 und GATA5 (Weber et al., 2000) in animalen Kappen Endoderm induzieren. Da die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren bereits nach 1,5 Stunden in Aktivin A und Retinsäure aktivierten animalen Kappen induziert sind (s. Abb. 6) und ihre Überexpression die Nierenentwicklung stark beeinflusst (Carroll and Vize, 1999; Wild et al., 2000; Wu et al., 2004; Tena et al., 2007), wurde angenommen, dass einer dieser Faktoren die Nephrogenese initiiert. Anders als erwartet führte die Überexpression von OSR1, LHX1 und/oder PAX8 und HNF1B aber nicht zur Induktion der Pronephrosdifferenzierung in animalen Kappen. Auch die Expression der anderen frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren blieb nahezu unbeeinflusst (s. Abb. 12B und 15B, Daten nicht gezeigt).

Kommt es zu keiner Differenzierung durch injizierte Transkriptionsfaktoren, so kann durch Zugabe von Wachstumsfaktoren eine Differenzierung in animalen Kappen ermöglicht werden. Für die Induktion der Neuralleistendifferenzierung durch Pax3 und Zic1 sind z.B. Wnt Signale nötig (Sato et al., 2005). Ebenso kann der Transkriptionsfaktor Neptune nur zusammen mit GATA1 und bFGF die Erythropoese in animalen Kappen induzieren (Huber et al., 2001). In Bezug auf die Pronephrosdifferenzierung würde das bedeuten, dass zuerst in den ektodermalen Zellen des animalen Pols Mesoderm durch die Zugabe von Mesoderm-Induktoren induziert werden muss. Aus diesem Grund wurden animale Kappen von OSR1 bzw. HNF1B injizierten Embryonen zusätzlich mit Aktivin A behandelt, ohne allerdings die Differenzierung in Pronephrosgewebe zu induzieren (s. Abb. 12A und 15A). Dass OSR1 nicht fähig ist, die Pronephrosdifferenzierung zu induzieren, ist verwunderlich, da OSR1 zu Beginn der Nierenentwicklung essentiell ist (Wang et al., 2005; James et al., 2006) und in *Xenopus in vivo* die drei frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren hnf1b, lhx1 und pax8 induzieren kann (Tena et al., 2007).

Mugford und Kollegen (2008) fanden für die Maus heraus, dass *Osr1* exprimierende Zellen multipotent und unerlässlich für die Entwicklung der nephrogenetischen Vorläuferzellen sind. Allerdings ist die *Osr1* Funktion auf die Bildung dieser Vorläuferzellen beschränkt, und Signale des umliegenden Gewebes sind notwendig, um die Nierenentwicklung zu induzieren (Mugford et al., 2008). Dies würde erklären, wieso *OSR1* allein in animalen Kappen keine Pronephrosdifferenzierung induzieren kann. Wenn aber *OSR1* die Bildung der Nierenvorläuferzellen induziert, dann könnte die Überexpression von *OSR1* in Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen zu einer verstärkten Pronephrosdifferenzierung führen. Da *OSR1* das Pronephrosdifferenzierungspotential von Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen nicht steigerte (s. Abb. 12A), scheinen weitere Signalmoleküle zu fehlen. Diese fehlenden benötigten Signale stammen vermutlich aus der Region der Pronephrosanlage, da ektopisches Nierengewebe in *OSR1* (s. Abb. 10B), *osr2* (Tena et al., 2007) oder *lhx1* und *pax8* (Carroll and Vize, 1999; Wu et al., 2004) überexprimierenden Embryonen ausschließlich in der Nähe des Pronephros gefunden wurde. Kürzliche Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass *wnt11b* ein solches Signal sein könnte (Tételin and Jones, 2010).

4.7 HNF1B induziert wichtige Faktoren der Nephrogenese in animalen Kappen

Die Untersuchung des Einflusses von HNF1B auf 26 potentielle *hnf1b* Zielgene ergab die Aktivierung von zehn Genen in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen (zusammengefasst in Abb. 22). Die Induktion von Genen, die für die Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *lhx1*, *hnf1a*, *hnf4a* und *tfe3* kodieren (s. Tab. 6), lässt vermuten, dass verschiedene Transkriptionskaskaden aktiviert werden. Diese Annahme wurde für *lhx1* näher untersucht. Die Analyse ergab die Induktion der *lhx1* Zielgene *cer1* (Yamamoto et al., 2003) und *chrd* (Mitchell et al., 2007), die beide eine wichtige Rolle in der Nephrogenese spielen. Ob diese Induktion direkt durch *lhx1* aktiviert wird, müsste näher untersucht werden, indem die Translation von *lhx1* durch Morpholinos blockiert wird. Andere *lhx1* Zielgene werden aber nicht aktiviert oder wie *goosecoid* (Agulnick et al., 1996) sogar herunterreguliert (s. Tab. 7). Das lässt vermuten, dass gleichzeitig andere Gene durch die HNF1B Expression aktiviert werden, die die Expression einiger *lhx1* Zielgene inhibieren. Auffällig ist, dass *cer1*

auf einem sehr hohen Level induziert ist und dann seine Expression innerhalb von sieben Stunden sehr stark zurückgeht. Vermutlich wird *cer1* durch *lhx1*, welches selbst transient von HNF1B induziert wird (s. Tab. 6), ebenfalls nur transient aktiviert.

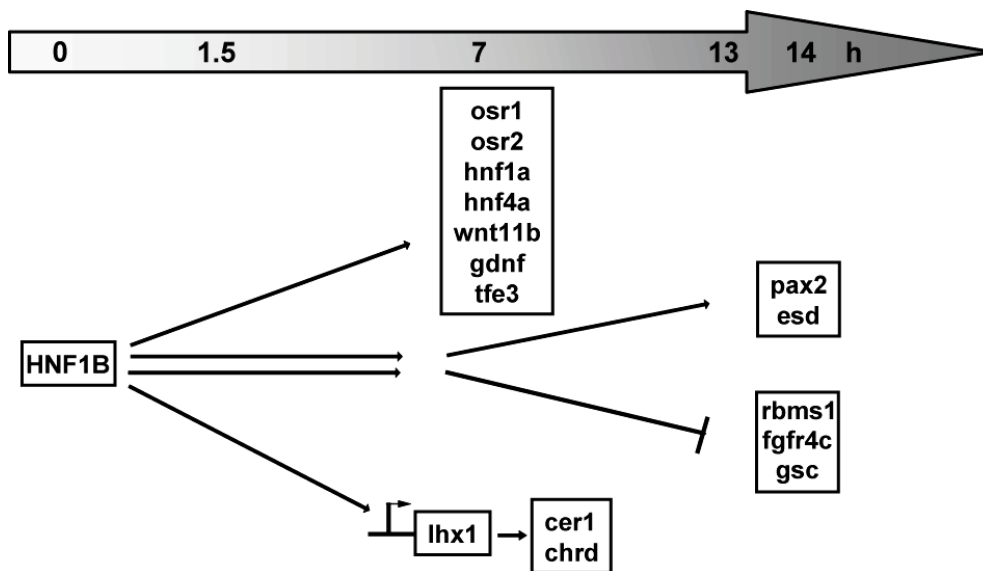


Abb. 22: Induktion wichtiger nephrogener Faktoren durch HNF1B in animalen Kappen.
Beschreibung siehe Text.

Die Aktivierung von *hnf1a* wurde erwartet, da bereits aus früheren Studien bekannt ist, dass die Expression von HNF1B in *Xenopus* Embryonen *hnf1a* aktiviert (Wild et al., 2000) und der *hnf1a* Promotor eine funktionelle HNF1 Bindestelle enthält (Zapp et al., 1993). Daher diente *hnf1a* in den Versuchen als Positivkontrolle einer erfolgreichen Injektion und HNF1B Expression.

Dass HNF1B die Expression von *osr1* und *osr2* induziert (s. Tab. 6) und umgekehrt *osr1* und *osr2* die Expression von *hnf1b* induzieren können (Tena et al., 2007), lässt auf eine positive Feedback-Schleife schließen. Die Herunterregulation der *hnf1b* Expression in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen nach drei Stunden (s. Abb. 15B) ist lediglich transient, da nach sieben Stunden keine Änderung des *hnf1b* Expressionslevels im Vergleich zu unbehandelten animalen Kappen mehr festgestellt werden konnte (s. Tab. 6). Möglich wäre, dass die negative Selbstregulation von *hnf1b* durch die Induktion von *osr1* und *osr2* und der damit verbundenen Induktion von *hnf1b* aufgehoben wird.

Zusätzlich konnte eine gesteigerte Expression der Signalmoleküle *wnt11b* (Tételin and Jones, 2010) und *gdnf* (Kyuno and Jones, 2007) festgestellt werden (s. Tab. 6), die beide eine wichtige Rolle in der Nephrogenese spielen. Ebenfalls von Bedeutung ist die Herunterregulation des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptors *fgfr4c* durch HNF1B in den animalen Kappen (s. Tab. 6), denn ohne eine Herunterregulation von *fgfr4c* in Pronephrosvorläuferzellen kann keine Pronephrosentwicklung erfolgen (Colas et al., 2008). Die verzögerte Induktion von *pax2* mit einer essentiellen Rolle in der Nephrogenese (Goode and Elgar, 2009) und Esterase D (*esd*) nach 14 Stunden (s. Tab. 6) lässt eine indirekte Aktivierung durch HNF1B vermuten.

Der Umstand, dass viele Gene, die ebenfalls wichtig in der Pronephrosentwicklung sind oder später in weiter differenzierten Pronephrosgeweben exprimiert sind, durch HNF1B in animalen Kappen nicht induziert werden, könnte darauf hindeuten, (i) dass *hnf1b* in *Xenopus* im Vergleich zu Säugern anders agiert oder aber wahrscheinlicher, (ii) dass *hnf1b* nur einen Teil dieser essentiellen Gene aktiviert, während andere notwendige Signale in den undifferenzierten Zellen der animalen Kappe fehlen. Nichtsdestotrotz zeigt die Analyse der HNF1B überexprimierenden animalen Kappen, dass *hnf1b* viele mögliche essentielle Gene der Nierenentwicklung in embryonalen Zellen der animalen Kappe induzieren kann.

4.8 Die Regulation von *lhx1* durch *hnf1b* über eine HNF1 Bindestelle ist evolutionär konserviert

Die Funktion von *Hnf1b* in der Nephrogenese wurde bereits in der Maus untersucht. Allerdings ist das Mausmodell für die Untersuchung der Funktion von *Hnf1b* nicht optimal, da eine heterozygote Deletion von *Hnf1b* keinen Einfluss auf die Nierenentwicklung hat und eine homozygote Deletion letal ist (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Erst durch konditionale Deletion konnte die Funktion von *Hnf1b* in der Maus näher untersucht werden (Gresh et al., 2004). Hierbei wurde das *Hnf1b*-Gen durch Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP) flankiert, wodurch eine Inaktivierung durch die Cre-Rekombinase ermöglicht wurde. Die Cre-Rekombinase wurde unter die Kontrolle des *Hnf1b* regulierten *Ksp-Cadherin* Promotors (Bai et al., 2002) gestellt. Da erst *Hnf1b* benötigt wird, um die Cre-Rekombinase zu aktivieren und eine *Hnf1b* Deletion zu erreichen, konnte die *Hnf1b* Funktion nur in der späten Nierenentwicklung untersucht werden.

Kürzlich wurde allerdings die Funktion von Hnf1b in der Nephrogenese in Mäusen beschrieben, in denen durch tetraploide Embryo-Komplementierung (Haumaître et al., 2005; Lokmane et al., 2008) die frühe Letalität vermieden wurde und Hnf1b homozygot deletiert werden konnte (Lokmane et al., 2010). Bei dieser Methode wird ein Zellverbund aus tetraploiden Zellen von Wildtyp-Mäusen mit diploiden embryonalen Stammzellen, in denen Hnf1b homozygot deletiert ist, komplementiert. Die innere Zellmasse der sich entwickelnden Blastozyste besteht so nur aus den dazugegebenen embryonalen Stammzellen, aus denen sich die spätere Maus entwickelt. In Hnf1b deletierten Mäusen ist die Pronephrosentwicklung gestört und die Expression vieler Schlüsselmoleküle der Nephrogenese wie Wnt9b, Lhx1 (Lim1), Pax2, Wnt11, Gdnf und Ret reduziert (Lokmane et al., 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Wnt9b, Lhx1 (Lim1) und Pax2, die eine oder mehrere HNF1 Bindestellen oberhalb des Promotors enthalten, durch Hnf1b reguliert werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte animale Kappensystem stellt eine weitere Methode dar, um den frühen Einfluss von hnf1b auf die Nephrogenese zu untersuchen. Auch in animalen Kappen konnte ein Einfluss von HNF1B auf die Expression von pax2, wnt11b und gdnf gezeigt werden (s. Tab. 6). Da auch in *Xenopus* eine zehnfach erhöhte Expression von lhx1 in HNF1B überexprimierenden animalen Kappen beobachtet wurde (s. Tab. 6) und diese Induktion über eine HNF1 Bindestelle in der Promotorregion von lhx1 erfolgt (s. Abb. 17 und 19), scheint die Regulation von lhx1 durch hnf1b evolutionär konserviert zu sein.

4.9 Das regulatorische Netzwerk der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in der Nephrogenese

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann folgendes Modell für das regulatorische Netzwerk der fünf frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in der Nephrogenese aufgestellt werden (Abb. 23):

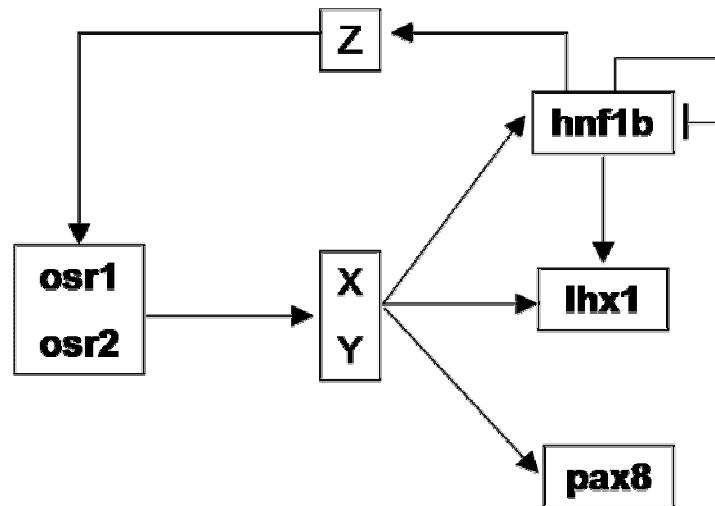


Abb. 23: Modell des regulatorischen Netzwerkes der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren. Beschreibung siehe Text. X, Y, Z: unbekannte Faktoren

Wie bereits bekannt ist, können sowohl *osr1* als auch *osr2* überexprimiert in Embryonen ektopisches Nierengewebe induzieren, in dem die drei anderen frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* exprimiert sind (Tena et al., 2007). Die Regulation von *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* durch *osr1* oder *osr2* muss aber über bisher unbekannte induzierte Faktoren erfolgen, da die Funktionsanalyse von *osr1* und *osr2* ergab, dass *osr1* und *osr2* als Repressoren fungieren (Tena et al., 2007). Diese Induktion konnte aber bislang nur im Embryo und nicht in animalen Kappen gezeigt werden (s. Abb. 12B). Möglich ist allerdings, dass diese unbekannten Faktoren erst durch *osr1* bzw. *osr2* induziert werden und somit erst später ein Einfluss auf die Expression von *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* zu beobachten ist. Um dies genauer zu analysieren, müssten animale Kappen von *osr1* oder *osr2* injizierten Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt als drei Stunden, evtl. nach sieben oder 14 Stunden Inkubation in Steinberg Lösung, auf die Expression der anderen Faktoren untersucht werden. Kann auch nach einer längeren Zeitspanne keine Induktion von *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* festgestellt werden, so würde das darauf hindeuten, dass die unbekannten Faktoren nicht direkt durch *osr1* oder *osr2* induziert werden, sondern aus dem umliegenden Gewebe der Pronephrosanlage kommen (s. 4.5) und somit in den animalen Kappen fehlen.

Die Induktion von *osr1* und *osr2* durch *hnf1b* (s. Tab. 6) wird vermutlich auch durch noch unbekannte Faktoren induziert, da beide Transkriptionsfaktoren erst nach

sieben Stunden in den HNF1B überexprimierenden animalen Kappen induziert werden, während sich nach drei Stunden noch keine Änderung der Expression zeigt (s. Abb. 15B). Die negative Selbstregulation von *hnf1b* (s. Abb. 15B) wird durch die positive Feedback-Schleife zwischen *osr1* und *osr2* und *hnf1b* aufgehoben. Ebenfalls wird *lhx1* durch *hnf1b* über eine funktionelle HNF1 Bindestelle in seiner Promotorregion induziert (s. Abb. 17 und 19).

Wie diese Arbeit gezeigt hat, hat keiner der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren das Potential in animalen Kappen Nierengewebe zu induzieren. Welches Signal der Expression dieser Faktoren übergeordnet ist, ist nicht bekannt. Tételin und Jones (2010) untersuchten kürzlich in Holtfreter-Sandwich-Kulturen, ob *wnt11* oder *wnt11b* dieses mögliche Signal sein könnten. Hierbei wurde intermediäres Mesoderm von unbehandelten Embryonen zwischen zwei animalen Kappen, die von *wnt11* bzw. *wnt11b* injizierten Embryonen geschnitten wurden, kultiviert. Nach ca. vier Tagen konnte eine Pronephrosdifferenzierung im intermediären Mesoderm durch sowohl den einen als auch den anderen Faktor festgestellt werden. Bei *wnt11* und *wnt11b* handelt es sich um sezernierte Faktoren, die von den animalen Kappen in das unbehandelte intermediäre Mesoderm gelangen und so dort die Differenzierung in Pronephros-gewebe induzieren können. Dagegen können weder *wnt11* noch *wnt11b* überexprimiert in animalen Kappen eine Pronephrosdifferenzierung induzieren (Tételin and Jones, 2010). Das Vorhandensein von Mesoderm scheint essentiell zu sein, um eine Pronephrosdifferenzierung durch Zugabe von Faktoren zu induzieren, wie die Holtfreter-Sandwich-Experimente (Tételin and Jones, 2010) und auch Experimente zur Induktion von ES-Zellen zu renalen Zelllinien zeigen (Osafune, 2010). Tételin und Jones (2010) vermuten, dass *wnt11*, obwohl es in den anterioren Somiten und den differenzierten Tubuli exprimiert ist und in Holtfreter-Sandwich-Kulturen die Pronephrosentwicklung induzieren kann, nicht das Signal zur Pronephrosinduktion *in vivo* ist. Durch *in situ* Analyse konnte gezeigt werden, dass *wnt11* nur in den dorsalen Spitzen der Somiten und nicht wie *wnt11b* überall in den Somiten exprimiert wird (Tételin and Jones, 2010). Auch in Mausembryonen scheint Wnt11, welches in der Spitze der Ureterknospe exprimiert ist, eine untergeordnete Rolle in der Nierenentwicklung zu spielen, da es *in vitro* keine Tubulibildung induziert (Kispert et al., 1998). Des Weiteren stellen Tételin und Jones die Theorie auf, dass *wnt11b* in Organismen wie *Xenopus* und Zebrafisch, bei

denen der Pronephros eine funktionale Form der embryonalen Niere darstellt, benötigt wird, während in Säugern, in denen der Pronephros nur eine rudimentäre Funktion hat, *wnt11b* vermutlich während der Evolution verloren gegangen ist (Garriock et al., 2007).

In *wnt11b*-injizierten Holtfreter-Sandwiches sind die nephrogenetischen Marker *pax2* und *pax8* induziert (Tételin and Jones, 2010). Dies würde dafür sprechen, dass *wnt11b* im nephrogenetischen Netzwerk über den anderen frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren steht. Allerdings zeigt die Analyse von HNF1B überexprimierenden animalen Kappen in dieser Arbeit eine Induktion von *wnt11b* durch HNF1B (s. Tab. 6). Um genauer zu analysieren, ob *wnt11b* ein übergeordnetes Signal in der Pronephrosentwicklung ist oder wie *wnt11b* mit den anderen Faktoren vernetzt ist, könnte zum einen das durch *wnt11b* induzierte intermediäre Mesoderm aus Holtfreter-Sandwich-Kulturen auf die Expression der anderen frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Zum anderen könnte getestet werden, ob auch *hnf1b* über die Induktion von *wnt11b* in Holtfreter-Sandwich-Kulturen im intermediären Mesoderm eine Pronephros-differenzierung induzieren kann.

Interessant wäre es darüber hinaus, alle fünf frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in Embryonen zu injizieren, animale Kappen zu schneiden und auf Pronephrosdifferenzierung zu analysieren. Schwierig wird hierbei allerdings, die geeignete Konzentration der Faktoren zu finden, so dass diese einen Effekt haben, aber noch nicht toxisch wirken. Des Weiteren wäre es denkbar, dass einige der über die Mikroarrayanalyse identifizierten Faktoren, welche in animalen Kappen durch Aktivin A und Retinsäure induziert werden (s. 3.2.3), in Kombination die Pronephrosentwicklung in animalen Kappen induzieren können. Um herauszufinden, welche dieser Faktoren essentiell sind, müssten zuerst alle oder ausgewählte Faktoren injiziert werden. Bei einer erfolgreichen Induktion müssten dann Mischungen getestet werden, in denen immer nur ein individueller Faktor fehlt, um so entbehrliche Faktoren zu identifizieren und schrittweise die wichtigen Faktoren der Pronephrosinduktion zu identifizieren. Über diese Ausschlussmethode konnten so z.B. aus neun möglichen Faktoren drei Transkriptionsfaktoren (*Ngn3*, *Pdx1* und *Mafa*) identifiziert werden, die benötigt werden, um differenzierte exocrine Pankreaszellen in beta-Zellen umzuprogrammieren (Zhou et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen eine genauere Vorstellung der Vernetzung von *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* in der Nephrogenese. Viele Faktoren und Verknüpfungen in dem komplexen nephrogenetischen Netzwerk sind aber weiterhin unbekannt und müssen noch entschlüsselt werden, bevor eine Nierenzüchtung aus ES-Zellen möglich ist. Sind die Induktoren der Nephrogenese dann bekannt, stellt eine weitere Schwierigkeit in der Organzüchtung der richtige Konzentrationsgradient dieser Faktoren dar, der dem *in vivo* entsprechen muss.

5 Zusammenfassung

Die frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* sind die ersten Gene, die in der Pronephrosanlage exprimiert werden. Über die Induktion der Nephrogenese und die regulatorische Verknüpfung dieser fünf Faktoren ist allerdings nur wenig bekannt. Da die Behandlung von undifferenzierten Explantaten des animalen Pols (animale Kappe) von *Xenopus* mit Aktivin A und Retinsäure die Pronephrosdifferenzierung induziert, stellte dieses System eine geeignete Methode dar, um in der vorliegenden Arbeit die Signalwege der Nephrogenese näher zu untersuchen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expressionskinetik der frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in mit Aktivin A und Retinsäure behandelten animalen Kappen untersucht. Die frühe Induktion von *osr1*, *osr2*, *hnf1b* und *lhx1* in behandelten animalen Kappen lässt drauf schließen, dass diese Faktoren direkte Zielgene von Aktivin A und Retinsäure sind, während für das später exprimierte *pax8* eine indirekte Aktivierung angenommen werden kann. Für Aktivin A konnte gezeigt werden, dass es allein *osr2* und *lhx1* nach drei Stunden induzieren kann. Im Gegensatz dazu kann Retinsäure allein keinen der fünf Faktoren induzieren. Die Mikroarrayanalyse induzierter animaler Kappen nach 1,5 Stunden ergab die Induktion der Genexpression vieler bekannter Zielgene von Aktivin A sowie wichtiger Faktoren der Nephrogenese und Mesodermentwicklung.

Die frühe Expression der fünf Transkriptionsfaktoren und ihre Beeinflussung der Pronephrosentwicklung, wenn sie überexprimiert werden, lässt vermuten, dass diese Faktoren überexprimiert möglicherweise die Nephrogenese in animalen Kappen induzieren können. Die Überexpression von *OSR1*, *HNF1B* in Kombination mit Aktivin A oder die gemeinsame Überexpression von *LHX1* und *PAX8* führte in animalen Kappen jedoch nicht zur Pronephrosentwicklung. Auch die Expression der anderen frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren blieb nahezu unbeeinflusst.

Die genauere Analyse von *HNF1B* überexprimierenden animalen Kappen ergab die Induktion von *osr1*, *osr2*, *hnf1a*, *hnf4a*, *wnt11b*, *gdnf* und *tfe3* nach sieben Stunden. Die Induktion von *pax2* und *esd* sowie die Herunterregulation von *rbms1*, *fgfr4c* und *gsc* nach 14 Stunden lässt sekundäre Effekte vermuten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *lhx1* zusätzlich zur bekannten Regulation durch Aktivin A über

ein Aktivin responsives Element auch durch HNF1B über eine funktionelle HNF1 Bindestelle im *lhx1* Promotor reguliert wird.

Insgesamt konnte durch diese Arbeit ein genauerer Einblick in das regulatorische Netzwerk der fünf frühen nephrogenetischen Transkriptionsfaktoren in der Nephrogenese im *Xenopus* Embryo gegeben werden, indem gezeigt wurde, dass *osr1*, *osr2* und *hnf1b* vermutlich über eine positive Feedback-Schleife reguliert sind, und *lhx1* direkt durch *hnf1b* über eine HNF1 Bindestelle aktiviert wird.

6 Literaturverzeichnis

Affymetrix (2010). www.affymetrix.com

Agulnick,A.D., Taira,M., Breen,J.J., Tanaka,T., Dawid,I.B., and Westphal,H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384**, 270-272.

Ang,H.L. and Duester,G. (1999). Retinoic acid biosynthetic enzyme ALDH1 localizes in a subset of retinoid-dependent tissues during xenopus development. *Dev. Dyn.* **215**, 264-272.

Ariizumi,T., Sawamura,K., Uchiyama,H., and Asashima,M. (1991). Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* **35**, 407-414.

Ariizumi,T. and Asashima,M. (2001). In vitro induction systems for analyses of amphibian organogenesis and body patterning. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 273-279.

Asashima,M., Kinoshita,K., Ariizumi,T., and Malacinski,G.M. (1999). Role of activin and other peptide growth factors in body patterning in the early amphibian embryo. *Int. Rev. Cytol.* **191**, 1-52.

Asashima,M., Ito,Y., Chan,T., Michiue,T., Nakanishi,M., Suzuki,K., Hitachi,K., Okabayashi,K., Kondow,A., and Ariizumi,T. (2009). In vitro organogenesis from undifferentiated cells in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* **238**, 1309-1320.

Bai,Y., Pontoglio,M., Hiesberger,T., Sinclair,A.M., and Igarashi,P. (2002). Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **283**, F839-F851.

Balczarek,K.A., Lai,Z.C., and Kumar,S. (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 829-842.

- Barbacci,E., Reber,M., Ott,M.O., Breillat,C., Huetz,F., and Cereghini,S.** (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* **126**, 4795-4805.
- Batourina,E., Gim,S., Bello,N., Shy,M., Clagett-Dame,M., Srinivas,S., Costantini,F., and Mendelsohn,C.** (2001). Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat. Genet.* **27**, 74-78.
- Beckers,D., Bellanne-Chantelot,C., and Maes,M.** (2007). Neonatal cholestatic jaundice as the first symptom of a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene (HNF-1beta). *J. Pediatr.* **150**, 313-314.
- Bellanne-Chantelot,C., Chauveau,D., Gautier,J.F., Dubois-Laforgue,D., Clauin,S., Beauvils,S., Wilhelm,J.M., Boitard,C., Noel,L.H., Velho,G. et al.** (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* **140**, 510-517.
- Belova,L., Sharma,S., Brickley,D.R., Nicolarsen,J.R., Patterson,C., and Conzen,S.D.** (2006). Ubiquitin-proteasome degradation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK-1) is mediated by the chaperone-dependent E3 ligase CHIP. *Biochem. J.* **400**, 235-244.
- Bernardini,G., Prati,M., Bonetti,E., and Scari,G.** (1999). Atlas of Xenopus Development. *Springer-Verlag, Italia*.
- Bingham,C., Ellard,S., Nicholls,A.J., Pennock,C.A., Allen,J., James,A.J., Satchell,S.C., Salzmann,M.B., and Hattersley,A.T.** (2001). The generalized aminoaciduria seen in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha mutations is a feature of all patients with diabetes and is associated with glucosuria. *Diabetes* **50**, 2047-2052.
- Bingham,C., Ellard,S., Van't Hoff,W.G., Simmonds,H.A., Marinaki,A.M., Badman,M.K., Winocour,P.H., Stride,A., Lockwood,C.R., Nicholls,A.J. et al.** (2003). Atypical familial juvenile hyperuricemic nephropathy associated with a hepatocyte nuclear factor-1beta gene mutation. *Kidney Int.* **63**, 1645-1651.
- Birsoy,B., Kofron,M., Schaible,K., Wylie,C., and Heasman,J.** (2006). Vg 1 is an essential signaling molecule in Xenopus development. *Development* **133**, 15-20.

- Blumberg,B.** (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural specification and neuronal differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **8**, 417-428.
- Bohn,S., Thomas,H., Turan,G., Ellard,S., Bingham,C., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U.** (2003). Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 2033-2041.
- Bouchard,M., Souabni,A., Mandler,M., Neubuser,A., and Busslinger,M.** (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev.* **16**, 2958-2970.
- Bowes,J.B., Snyder,K.A., Segerdell,E., Jarabek,C.J., Azam,K., Zorn,A.M., and Vize,P.D.** (2010). Xenbase: gene expression and improved integration. *Nucleic Acids Res.* **38**, D607-D612.
- Brändli,A.W.** (1999). Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Int. J. Dev. Biol.* **43**, 381-395.
- Brennan,H.C., Nijjar,S., and Jones,E.A.** (1999). The specification and growth factor inducibility of the pronephric glomus in *Xenopus laevis*. *Development* **126**, 5847-5856.
- Brunskill,E.W., Aronow,B.J., Georgas,K., Rumballe,B., Valerius,M.T., Aronow,J., Kaimal,V., Jegga,A.G., Grimmond,S., McMahon,A.P. et al.** (2008). Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Dev. Cell* **15**, 781-791.
- Carroll,T., Wallingford,J., Seufert,D., and Vize,P.D.** (1999). Molecular regulation of pronephric development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44**, 67-100.
- Carroll,T.J. and Vize,P.D.** (1999). Synergism between Pax-8 and lim-1 in embryonic kidney development. *Dev. Biol.* **214**, 46-59.
- Cartry,J., Nichane,M., Ribes,V., Colas,A., Riou,J.F., Pieler,T., Dolle,P., Bellefroid,E.J., and Umbhauer,M.** (2006). Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate. *Dev. Biol.* **299**, 35-51.
- Cereghini,S., Blumenfeld,M., and Yaniv,M.** (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* **2**, 957-974.

- Cereghini,S.** (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* **10**, 267-282.
- Cha,Y.R., Takahashi,S., and Wright,C.V.** (2006). Cooperative non-cell and cell autonomous regulation of Nodal gene expression and signaling by Lefty/Antivin and Brachyury in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **290**, 246-264.
- Chan,T., Ariizumi,T., and Asashima,M.** (1999). A model system for organ engineering: transplantation of in vitro induced embryonic kidney. *Naturwissenschaften* **86**, 224-227.
- Chan,T., Takahashi,S., and Asashima,M.** (2000). A role for Xlim-1 in pronephros development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **228**, 256-269.
- Chan,T. and Asashima,M.** (2006). Growing Kidney in the Frog. *Nephron Exp. Nephrol.* **103**, e81-e85.
- Chen,Y., Pollet,N., Niehrs,C., and Pieler,T.** (2001). Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **101**, 91-103.
- Clements,D., Cameleyre,I., and Woodland,H.R.** (2003). Redundant early and overlapping larval roles of Xsox17 subgroup genes in *Xenopus* endoderm development. *Mech. Dev.* **120**, 337-348.
- Coffinier,C., Thépot,D., Babinet,C., Yaniv,M., and Barra,J.** (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1b in visceral endoderm differentiation. *Development* **126**, 4785-4794.
- Colas,A., Cartry,J., Buisson,I., Umbhauer,M., Smith,J.C., and Riou,J.F.** (2008). Mix.1/2-dependent control of FGF availability during gastrulation is essential for pronephros development in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **320**, 351-365.
- Coulter,D.E. and Wieschaus,E.** (1988). Gene activities and segmental patterning in *Drosophila*: analysis of odd-skipped and pair-rule double mutants. *Genes Dev.* **2**, 1812-1823.

- Cunliffe,V. and Smith,J.C.** (1992). Ectopic mesoderm formation in *Xenopus* embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. *Nature* **358**, 427-430.
- Curtiss,J. and Heilig,J.S.** (1998). DeLIMiting development. *Bioessays* **20**, 58-69.
- Dawid,I.B., Breen,J.J., and Toyama,R.** (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* **14**, 156-162.
- Demartis,A., Maffei,M., Vignali,R., Barsacchi,G., and De Simone,V.** (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **47**, 19-28.
- Deryckere,F., Byrnes,L., Wagner,A., McMorro,T., and Gannon,F.** (1995). Salmon HNF1: cDNA sequence, evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter. *J. Mol. Biol.* **247**, 1-10.
- Dressler,G.R.** (2009). Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development* **136**, 3863-3874.
- Dudziak,K., Mottalebi,N., Senkel,S., Edghill,E.L., Rosengarten,S., Roose,M., Bingham,C., Ellard,S., and Ryffel,G.U.** (2008). Transcription factor HNF1beta and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney Int.* **74**, 210-217.
- Duester,G.** (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* **134**, 921-931.
- Eccles,M.R. and Schimmenti,L.A.** (1999). Renal-coloboma syndrome: a multi-system developmental disorder caused by PAX2 mutations. *Clin. Genet.* **56**, 1-9.
- Edghill,E.L., Bingham,C., Ellard,S., and Hattersley,A.T.** (2006). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes. *J. Med. Genet* **43**, 84-90.
- Emerson,B.M.** (2002). Specificity of gene regulation. *Cell* **109**, 267-270.
- Evan,G.I., Lewis,G.K., Ramsay,G., and Bishop,J.M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell Biol.* **5**, 3610-3616.

- Fletcher,R.B., Baker,J.C., and Harland,R.M.** (2006). FGF8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in *Xenopus*. *Development* **133**, 1703-1714.
- Frain,M., Swart,G., Monaci,P., Nicosia,A., Stampfli,S., Frank,R., and Cortese,R.** (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* **59**, 145-157.
- Garriock,R.J., Warkman,A.S., Meadows,S.M., D'Agostino,S., and Krieg,P.A.** (2007). Census of vertebrate Wnt genes: isolation and developmental expression of *Xenopus* Wnt2, Wnt3, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, and Wnt16. *Dev. Dyn.* **236**, 1249-1258.
- Goode,D.K. and Elgar,G.** (2009). The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev. Dyn.* **238**, 2951-2974.
- Gresh,L., Fischer,E., Reimann,A., Tanguy,M., Garbay,S., Shao,X., Hiesberger,T., Fiette,L., Igarashi,P., Yaniv,M. et al.** (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* **23**, 1657-1668.
- Grieshammer,U., Cebrian,C., Ilagan,R., Meyers,E., Herzlinger,D., and Martin,G.R.** (2005). FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. *Development* **132**, 3847-3857.
- Gurdon,J.B., Mitchell,A., and Ryan,K.** (1996). An experimental system for analyzing response to a morphogen gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9334-9338.
- Hart,M.C., Wang,L., and Coulter,D.E.** (1996). Comparison of the structure and expression of odd-skipped and two related genes that encode a new family of zinc finger proteins in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 171-182.
- Haumaître,C., Barbacci,E., Jenny,M., Ott,M.O., Gradwohl,G., and Cereghini,S.** (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 1490-1495.

- Haumaître,C., Fabre,M., Cormier,S., Baumann,C., Delezoide,A.L., and Cereghini,S.** (2006). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1 β /MODY5 mutations. *Hum. Mol. Genet* **15**, 2363-2375.
- Heasman,J.** (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev. Biol.* **243**, 209-214.
- Heller,N. and Brändli,A.W.** (1999). Xenopus Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. *Dev. Genet.* **24**, 208-219.
- Henry,G.L. and Melton,D.A.** (1998). Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. *Science* **281**, 91-96.
- Hobert,O. and Westphal,H.** (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* **16**, 75-83.
- Horikawa,Y., Iwasaki,N., Hara,M., Furuta,H., Hinokio,Y., Cockburn,B.N., Lindner,T., Yamagata,K., Ogata,M., Tomonaga,O. et al.** (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* **17**, 384-385.
- Hörz,W.** (1994). Chromatin structure and gene regulation. *Naturwissenschaften* **81**, 74-78.
- Huber,T.L., Perkins,A.C., Deconinck,A.E., Chan,F.Y., Mead,P.E., and Zon,L.I.** (2001). neptune, a Kruppel-like transcription factor that participates in primitive erythropoiesis in Xenopus. *Curr. Biol.* **11**, 1456-1461.
- Hudson,C., Clements,D., Friday,R.V., Stott,D., and Woodland,H.R.** (1997). Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in Xenopus. *Cell* **91**, 397-405.
- Hukriede,N.A., Tsang,T.E., Habas,R., Khoo,P.L., Steiner,K., Weeks,D.L., Tam,P.P., and Dawid,I.B.** (2003). Conserved requirement of Lim1 function for cell movements during gastrulation. *Dev. Cell* **4**, 83-94.

- Inohara,N., Koseki,T., Chen,S., Wu,X., and Nunez,G.** (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* **17**, 2526-2533.
- James,R.G., Kamei,C.N., Wang,Q., Jiang,R., and Schultheiss,T.M.** (2006). Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. *Development* **133**, 2995-3004.
- Jones,C.M., Kuehn,M.R., Hogan,B.L., Smith,J.C., and Wright,C.V.** (1995). Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**, 3651-3662.
- Jones,E.A.** (2005). Xenopus: a prince among models for pronephric kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 313-321.
- Katoh,M.** (2002). Molecular cloning and characterization of OSR1 on human chromosome 2p24. *Int. J. Mol. Med.* **10**, 221-225.
- Kavka,A.I. and Green,J.B.** (2000). Evidence for dual mechanisms of mesoderm establishment in Xenopus embryos. *Dev. Dyn.* **219**, 77-83.
- Kawai,S., Kato,T., Inaba,H., Okahashi,N., and Amano,A.** (2005). Odd-skipped related 2 splicing variants show opposite transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 306-311.
- Kawai,S., Yamauchi,M., Wakisaka,S., Ooshima,T., and Amano,A.** (2007). Zinc-finger transcription factor odd-skipped related 2 is one of the regulators in osteoblast proliferation and bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1362-1372.
- Kim,D. and Dressler,G.R.** (2005). Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3527-3534.
- Kingston,R.E., Bunker,C.A., and Imbalzano,A.N.** (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* **10**, 905-920.

- Kispert,A., Vainio,S., and McMahon,A.P.** (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* **125**, 4225-4234.
- Kobayashi,A., Shawlot,W., Kania,A., and Behringer,R.R.** (2004). Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development* **131**, 539-549.
- Kofron,M., Wylie,C., and Heasman,J.** (2004). The role of Mixer in patterning the early *Xenopus* embryo. *Development* **131**, 2431-2441.
- Kolatsi-Joannou,M., Bingham,C., Ellard,S., Bulman,M.P., Allen,L.I., Hattersley,A.T., and Woolf,A.S.** (2001). Hepatocyte nuclear factor-1beta: a new kindred with renal cysts and diabetes and gene expression in normal human development. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2175-2180.
- Kolm,P.J. and Sive,H.L.** (1995). Regulation of the *Xenopus* labial homeodomain genes, HoxA1 and HoxD1: activation by retinoids and peptide growth factors. *Dev. Biol.* **167**, 34-49.
- Kroll,K.L. and Amaya,E.** (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* **122**, 3173-3183.
- Kyuno,J. and Jones,E.A.** (2007). GDNF expression during *Xenopus* development. *Gene Expr. Patterns.* **7**, 313-317.
- Laemmli,U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lan,Y., Kingsley,P.D., Cho,E.S., and Jiang,R.** (2001). Osr2, a new mouse gene related to *Drosophila* odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mech. Dev* **107**, 175-179.
- Lan,Y., Ovitt,C.E., Cho,E.S., Maltby,K.M., Wang,Q., and Jiang,R.** (2004). Odd-skipped related 2 (Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development* **131**, 3207-3216.

- Liao,J., Wu,Z., Wang,Y., Cheng,L., Cui,C., Gao,Y., Chen,T., Rao,L., Chen,S., Jia,N. et al.** (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* **18**, 600-603.
- Lindner,T.H., Njolstad,P.R., Horikawa,Y., Bostad,L., Bell,G.I., and Sovik,O.** (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2001-2008.
- Liu,X., Kiss,I., and Lengyel,J.A.** (1999). Identification of genes controlling malpighian tubule and other epithelial morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**, 685-695.
- Lokmane,L., Haumaitre,C., Garcia-Villalba,P., Anselme,I., Schneider-Maunoury,S., and Cereghini,S.** (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* **135**, 2777-2786.
- Lokmane,L., Heliot,C., Garcia-Villalba,P., Fabre,M., and Cereghini,S.** (2010). vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* **137**, 347-357.
- Lowry,W.E., Richter,L., Yachechko,R., Pyle,A.D., Tchieu,J., Sridharan,R., Clark,A.T., and Plath,K.** (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 2883-2888.
- Macchia,P.E., Lapi,P., Krude,H., Pirro,M.T., Missero,C., Chiovato,L., Souabni,A., Baserga,M., Tassi,V., Pinchera,A. et al.** (1998). PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat. Genet.* **19**, 83-86.
- Maherali,N., Sridharan,R., Xie,W., Utikal,J., Eminli,S., Arnold,K., Stadtfeld,M., Yachechko,R., Tchieu,J., Jaenisch,R. et al.** (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70.
- Mansouri,A., Chowdhury,K., and Gruss,P.** (1998). Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat. Genet.* **19**, 87-90.

Mauch,T.J., Yang,G., Wright,M., Smith,D., and Schoenwolf,G.C. (2000). Signals from trunk paraxial mesoderm induce pronephros formation in chick intermediate mesoderm. *Dev. Biol.* **220**, 62-75.

Meier,P., Finch,A., and Evan,G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.

Mendel,D.B., Hansen,L.P., Graves,M.K., Conley,P.B., and Crabtree,G.R. (1991). HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* **5**, 1042-1056.

Mitchell,T., Jones,E.A., Weeks,D.L., and Sheets,M.D. (2007). Chordin affects pronephros development in *Xenopus* embryos by anteriorizing presomitic mesoderm. *Dev Dyn.* **236**, 251-261.

Mochizuki,T., Karavanov,A.A., Curtiss,P.E., Ault,K.T., Sugimoto,N., Watabe,T., Shiokawa,K., Jamrich,M., Cho,K.W., Dawid,I.B. et al. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the goosecoid promoter. *Dev. Biol.* **224**, 470-485.

Mohn,D., Chen,S.W., Dias,D.C., Weinstein,D.C., Dyer,M.A., Sahr,K., Ducker,C.E., Zahradka,E., Keller,G., Zaret,K.S. et al. (2003). Mouse Mix gene is activated early during differentiation of ES and F9 stem cells and induces endoderm in frog embryos. *Dev. Dyn.* **226**, 446-459.

Moriya,N., Uchiyama,H., and Asashima,M. (1993). Induction of pronephric tubules by activin and retinoic acid in presumptive ectoderm of *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* **35**, 123-128.

Mugford,J.W., Sipila,P., McMahon,J.A., and McMahon,A.P. (2008). Osr1 expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an Osr1-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev. Biol.* **324**, 88-98.

Murry,C.E. and Keller,G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* **132**, 661-680.

- Nakata,K., Nagai,T., Aruga,J., and Mikoshiba,K.** (1997). *Xenopus Zic3*, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11980-11985.
- Niederreither,K. and Dolle,P.** (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 541-553.
- Nielsen,D.A. and Shapiro,D.J.** (1986). Preparation of capped RNA transcripts using T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5936.
- Nieuwkoop,P.D. and Faber,J.** (1975). *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co.
- Nitta,K.R., Takahashi,S., Haramoto,Y., Fukuda,M., Onuma,Y., and Asashima,M.** (2006). Expression of Sox1 during *Xenopus* early embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 287-293.
- Nüsslein-Volhard,C. and Wieschaus,E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Okabayashi,K. and Asashima,M.** (2003). Tissue generation from amphibian animal caps. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 502-507.
- Okita,K., Ichisaka,T., and Yamanaka,S.** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317.
- Olive,M., Thiebaud,P., Landry,M., Duvert,M., Verna,A., Barillot,W., and Theze,N.** (2003). Using *Xenopus* as a model system for an undergraduate laboratory course in vertebrate development at the University of Bordeaux, France. *Int. J. Dev. Biol.* **47**, 153-160.
- Ori,M., Nardini,M., Casini,P., Perris,R., and Nardi,I.** (2006). XHas2 activity is required during somitogenesis and precursor cell migration in *Xenopus* development. *Development* **133**, 631-640.
- Orphanides,G., Lagrange,T., and Reinberg,D.** (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**, 2657-2683.

- Osafune,K., Nishinakamura,R., Komazaki,S., and Asashima,M.** (2002). In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Dev. Growth Differ.* **44**, 161-167.
- Osafune,K.** (2010). In vitro regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Exp. Cell Res.* **316**, 2571-2577.
- Perantoni,A.O., Timofeeva,O., Naillat,F., Richman,C., Pajni-Underwood,S., Wilson,C., Vainio,S., Dove,L.F., and Lewandoski,M.** (2005). Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* **132**, 3859-3871.
- Pillai,R.S., Bhattacharyya,S.N., Artus,C.G., Zoller,T., Cougot,N., Basyuk,E., Bertrand,E., and Filipowicz,W.** (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-1576.
- Portales-Casamar,E., Thongjuea,S., Kwon,A.T., Arenillas,D., Zhao,X., Valen,E., Yusuf,D., Lenhard,B., Wasserman,W.W., and Sandelin,A.** (2010). JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* **38**, D105-D110.
- Rebagliati,M.R., Weeks,D.L., Harvey,R.P., and Melton,D.A.** (1985). Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* **42**, 769-777.
- Rebbert,M.L. and Dawid,I.B.** (1997). Transcriptional regulation of the *Xlim-1* gene by activin is mediated by an element in intron I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 9717-9722.
- Rosa,F.M.** (1989). *Mix.1*, a homeobox mRNA inducible by mesoderm inducers, is expressed mostly in the presumptive endodermal cells of *Xenopus* embryos. *Cell* **57**, 965-974.
- Rupp,R.A., Snider,L., and Weintraub,H.** (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of *XMyoD*. *Genes Dev.* **8**, 1311-1323.
- Ryan,K., Garrett,N., Mitchell,A., and Gurdon,J.B.** (1996). *Eomesodermin*, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation. *Cell* **87**, 989-1000.

- Ryan,K., Garrett,N., Bourillot,P., Stennard,F., and Gurdon,J.B.** (2000). The *Xenopus* eomesodermin promoter and its concentration-dependent response to activin. *Mech. Dev.* **94**, 133-146.
- Ryffel,G.U.** (2003). What can a frog tell us about human kidney development. *Nephron Exp. Nephrol.* **94**, e35-e43.
- Ryffel,G.U.** (2010). HNF1B (*Homo sapiens*). In *Transcription Factor Encyclopedia*, <http://www.cisreg.ca/tfe>. Accessed July 15, 2010.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T.** (1989). In *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory.
- Sato,T., Sasai,N., and Sasai,Y.** (2005). Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in *Xenopus* ectoderm. *Development* **132**, 2355-2363.
- Saxén,L.** (1987). Ontogenesis of the vertebrate excretory system. In *Organogenesis of the Kidney*. 1-34. Cambridge, Cambridge University Press.
- Senkel,S., Lucas,B., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U.** (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **1731**, 179-190.
- Seufert,D.W., Brennan,H.C., DeGuire,J., Jones,E.A., and Vize,P.D.** (1999). Developmental basis of pronephric defects in *Xenopus* body plan phenotypes. *Dev. Biol.* **215**, 233-242.
- Shawlot,W. and Behringer,R.R.** (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**, 425-430.
- Sinner,D., Kirilenko,P., Rankin,S., Wei,E., Howard,L., Kofron,M., Heasman,J., Woodland,H.R., and Zorn,A.M.** (2006). Global analysis of the transcriptional network controlling *Xenopus* endoderm formation. *Development* **133**, 1955-1966.
- Sive,H.L. and Cheng,P.F.** (1991). Retinoic acid perturbs the expression of *Xhox.lab* genes and alters mesodermal determination in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **5**, 1321-1332.

- Sive,H., Grainger,R.M., and Harland,R.M.** (2000). *Early development of Xenopus laevis, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- So,P.L. and Danielian,P.S.** (1999). Cloning and expression analysis of a mouse gene related to Drosophila odd-skipped. *Mech. Dev.* **84**, 157-160.
- Sun,Z. and Hopkins,N.** (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* **15**, 3217-3229.
- Tada,M., O'Reilly,M.A., and Smith,J.C.** (1997). Analysis of competence and of Brachyury autoinduction by use of hormone-inducible Xbra. *Development* **124**, 2225-2234.
- Tada,M., Casey,E.S., Fairclough,L., and Smith,J.C.** (1998). Bix1, a direct target of Xenopus T-box genes, causes formation of ventral mesoderm and endoderm. *Development* **125**, 3997-4006.
- Tadano,T., Otani,H., Taira,M., and Dawid,I.B.** (1993). Differential induction of regulatory genes during mesoderm formation in Xenopus laevis embryos. *Dev. Genet.* **14**, 204-211.
- Taira,M., Jamrich,M., Good,P.J., and Dawid,I.B.** (1992). The LIM domain-containing homeo box gene Xlim-1 is expressed specifically in the organizer region of Xenopus gastrula embryos. *Genes Dev.* **6**, 356-366.
- Taira,M., Otani,H., Jamrich,M., and Dawid,I.B.** (1994a). Expression of the LIM class homeobox gene Xlim-1 in pronephros and CNS cell lineages of Xenopus embryos is affected by retinoic acid and exogastrulation. *Development* **120**, 1525-1536.
- Taira,M., Otani,H., Saint-Jeannet,J.P., and Dawid,I.B.** (1994b). Role of the LIM class homeodomain protein Xlim-1 in neural and muscle induction by the Spemann organizer in Xenopus. *Nature* **372**, 677-679.
- Takahashi,K. and Yamanaka,S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

- Takahashi,K., Tanabe,K., Ohnuki,M., Narita,M., Ichisaka,T., Tomoda,K., and Yamanaka,S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Takekawa,M. and Saito,H.** (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95**, 521-530.
- Takenaga,M., Fukumoto,M., and Hori,Y.** (2007). Regulated Nodal signaling promotes differentiation of the definitive endoderm and mesoderm from ES cells. *J. Cell Sci.* **120**, 2078-2090.
- Tanegashima,K., Yokota,C., Takahashi,S., and Asashima,M.** (2000). Expression cloning of Xantivin, a *Xenopus* lefty/antivin-related gene, involved in the regulation of activin signaling during mesoderm induction. *Mech. Dev.* **99**, 3-14.
- Tena,J.J., Neto,A., de,I.C.-M., Bras-Pereira,C., Casares,F., and Gomez-Skarmeta,J.L.** (2007). Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev. Biol.* **301**, 518-531.
- Tételin,S. and Jones,E.A.** (2010). *Xenopus* Wnt11b is identified as a potential pronephric inducer. *Dev. Dyn.* **239**, 148-159.
- Thomas,H., Jaschowitz,K., Bulman,M., Frayling,T.M., Mitchell,S.M., Roosen,S., Lingott-Frieg,A., Tack,C.J., Ellard,S., Ryffel,G.U. et al.** (2001). A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2089-2097.
- Thomas,M.C. and Chiang,C.M.** (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105-178.
- Tjian,R.** (1996). The biochemistry of transcription in eukaryotes: a paradigm for multisubunit regulatory complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **351**, 491-499.
- Torres,M., Gomez-Pardo,E., Dressler,G.R., and Gruss,P.** (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* **121**, 4057-4065.

Tsang,T.E., Shawlot,W., Kinder,S.J., Kobayashi,A., Kwan,K.M., Schughart,K., Kania,A., Jessell,T.M., Behringer,R.R., and Tam,P.P. (2000). Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **223**, 77-90.

Uddin,R.K. and Singh,S.M. (2006). cis-Regulatory sequences of the genes involved in apoptosis, cell growth, and proliferation may provide a target for some of the effects of acute ethanol exposure. *Brain Res.* **1088**, 31-44.

Unigene (2010). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>

Uochi,T. and Asashima,M. (1996). Sequential gene expression during pronephric tubule formation in vitro in xenopus ectoderm. *Dev. Growth Differ.* **38**, 625-634.

Urban,A.E., Zhou,X., Ungos,J.M., Raible,D.W., Altmann,C.R., and Vize,P.D. (2006). FGF is essential for both condensation and mesenchymal-epithelial transition stages of pronephric kidney tubule development. *Dev. Biol.* **297**, 103-117.

Villard,J. (2004). Transcription regulation and human diseases. *Swiss. Med. Wkly.* **134**, 571-579.

Vize,P.D., Jones,E.A., and Pfister,R. (1995). Development of the Xenopus pronephric system. *Dev. Biol.* **171**, 531-540.

Vize,P.D., Seufert,D.W., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* **188**, 189-204.

Vize,P.D., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (2003). Introduction: Embryonic Kidneys and other nephrogenic models. In *The Kidney: From Normal Development to Congenital Disease*. (ed. Vize,P.D., Woolf,A.S., and Bard,J.B.L.), 1-6. Amsterdam: Academic Press.

von Dassow G., Schmidt,J.E., and Kimelman,D. (1993). Induction of the Xenopus organizer: expression and regulation of Xnot, a novel FGF and activin-regulated homeo box gene. *Genes Dev.* **7**, 355-366.

- Wang,Q., Lan,Y., Cho,E.S., Maltby,K.M., and Jiang,R.** (2005). Odd-skipped related 1 (Odd 1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol.* **288**, 582-594.
- Watanabe,M., Rebbert,M.L., Andreazzoli,M., Takahashi,N., Toyama,R., Zimmerman,S., Whitman,M., and Dawid,I.B.** (2002). Regulation of the Lim-1 gene is mediated through conserved FAST-1/FoxH1 sites in the first intron. *Dev Dyn.* **225**, 448-456.
- Weber,H., Holewa,B., Jones,E.A., and Ryffel,G.U.** (1996). Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the HNF4-binding site as an activin A responsive element in the Xenopus HNF1alpha promoter. *Development* **122**, 1975-1984.
- Weber,H., Symes,C.E., Walmsley,M.E., Rodaway,A.R., and Patient,R.K.** (2000). A role for GATA5 in Xenopus endoderm specification. *Development* **127**, 4345-4360.
- Weeks,D.L. and Melton,D.A.** (1987). A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in Xenopus eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* **51**, 861-867.
- Wernig,M., Meissner,A., Foreman,R., Brambrink,T., Ku,M., Hochedlinger,K., Bernstein,B.E., and Jaenisch,R.** (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-324.
- Wild,W., Pogge v.Strandmann,E., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U.** (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing Xenopus embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 4695-4700.
- Wirsing,A., Johnstone,K.A., Harries,L.W., Ellard,S., Ryffel,G.U., Stanik,J., Gasperikova,D., Klimes,I., and Murphy,R.** (2010). Novel monogenic diabetes mutations in the P2 promoter of the HNF4A gene are associated with impaired function in vitro. *Diabet. Med.* **27**, 631-635.

- Wu,G., Bohn,S., and Ryffel,G.U.** (2004). The HNF1beta transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/lim1-induced kidney malformations. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3715-3728.
- Xie,S., Wu,H., Wang,Q., Cogswell,J.P., Husain,I., Conn,C., Stambrook,P., Jhanwar-Uniyal,M., and Dai,W.** (2001). Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 43305-43312.
- Yamamoto,S., Hikasa,H., Ono,H., and Taira,M.** (2003). Molecular link in the sequential induction of the Spemann organizer: direct activation of the cerberus gene by Xlim-1, Xotx2, Mix.1, and Siamois, immediately downstream from Nodal and Wnt signaling. *Dev. Biol.* **257**, 190-204.
- Yasuo,H. and Lemaire,P.** (2001). Role of Goosecoid, Xnot and Wnt antagonists in the maintenance of the notochord genetic programme in *Xenopus* gastrulae. *Development* **128**, 3783-3793.
- Yu,J., Vodyanik,M.A., Smuga-Otto,K., ntosiewicz-Bourget,J., Frane,J.L., Tian,S., Nie,J., Jonsdottir,G.A., Ruotti,V., Stewart,R. et al.** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.
- Zapp,D., Bartkowski,S., Holewa,B., Zoidl,C., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U.** (1993). Elements and factors involved in tissue-specific and embryonic expression of the liver transcription factor LFB1 in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6416-6426.
- Zernicka-Goetz,M., Pines,J., Ryan,K., Siemering,K.R., Haseloff,J., Evans,M.J., and Gurdon,J.B.** (1996). An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* **122**, 3719-3724.
- Zhang,Z., Lan,Y., Chai,Y., and Jiang,R.** (2009). Antagonistic actions of Msx1 and Osr2 pattern mammalian teeth into a single row. *Science* **323**, 1232-1234.
- Zhou,Q., Brown,J., Kanarek,A., Rajagopal,J., and Melton,D.A.** (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*.

7 Anhang

Tab. 8: Gentranskripte, die nach 1,5 Stunden Inkubation mit Aktivin A und Retinsäure in animalen Kappen induziert waren. Die in beiden unabhängigen Versuchen hochregulierten Gene (Änderung $\geq 1,0$ und $< 1,5$, $p < 0,002$) und der Mittelwert ihrer x-fachen Induktion sind aufgelistet. Gensymbol und Genname stammen von Xenbase (Bowes et al., 2010), wenn das Probeset gelistet war. Wurde der Genname über Affymetrix identifiziert, so wurde das entsprechende Gensymbol (Xenbase), wenn bekannt, zusätzlich in Klammern eingefügt. (p) provisorischer Name bei Xenbase (Stand August 2010); [1] nicht bei Xenbase gelistet (Stand August 2010); [2] nach UniGene (Unigene, 2010) in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009); [3] nach „Target Sequence“ in der „Probe Design Information“ (Affymetrix, Stand April 2009); [4] Probeset detektiert *Xenopus tropicalis*; [5] Sequenz bei NCBI für *Xenopus* nicht gefunden (Stand August 2010).

Gensymbol	Genname	Probeset	x-fache Induktion
---	clathrin, light chain B (cltb (p)) [2, 3]	XI.2446.1.S1_at [1]	1,4
---	aldolase B, fructose-bisphosphate (aldob (p)) [2, 3]	XI.7780.3.S1_a_at [1]	1,4
---	zu 93% vergl. zu sprouty homolog 1 (spry19) [2, 3, 4]	XI.10087.1.A1_at [1]	1,4
hmgn3	high mobility group nucleosomal binding domain 3	XI.21995.1.S1_s_at	1,4
rtn4	reticulon 4	XI.24743.1.A1_at	1,4
junb	jun B proto-oncogene	XI.16457.1.A1_at	1,4
---	hypothetical protein LOC100158389 [2, 3]	XI.16774.1.S1_at [1]	1,4
---	stromal cell-derived factor 2-like 1 (sdf2l1(p)) [2]	XI.5458.1.A1_at [1, 5]	1,4
has1	hyaluronan synthase	XI.4517.1.S1_at	1,4
cidea	cell death-inducing DFFA-like effector a	XI.25419.2.A1_at	1,4
ddit4 (p)	DNA damage-inducible transcript 4	XI.6615.1.A1_at	1,4
ccne1	cyclin E3	XI.4606.1.S1_at	1,4
---	zu 70% vergl. zu <i>Xenopus tropicalis</i> finished cDNA, clone TNeu050f17 [3, 4]	XI.26114.1.A1_at [1]	1,4
---	nuclear transport factor 2 / nuclear transport factor p10 (nutf2 (p)) [2,3]	XI.1791.1.S1_at [1]	1,3
dact1	dapper, antagonist of beta-catenin	XI.7602.1.S2_at	1,3
---	zu 90% vergl. zu <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> DNA-damage-inducible transcript 4 (ddit4 (p)) [3, 4]	XI.12284.1.A1_at [1]	1,3
eapp (p)	E2F-associated phosphoprotein	XI.1346.1.A1_at	1,3
---	zu 83% vergl. zu cell division cycle 42 (cdc42 (p)) [2, 3]	XI.715.2.A1_at [1]	1,3
---	zu 97% vergl. zu <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i> sirtuin 4 (sirt4 (p)) [3, 4]	XI.11393.1.A1_at [1]	1,3
ets2 (p)	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	XI.1149.1.S1_at	1,3
tmem167a (p)	transmembrane protein 167A	XI.15832.1.S1_at	1,3
---	NHP2 ribonucleoprotein homolog (nhp2 (p)) [2, 3]	XI.23927.3.S1_a_at [1]	1,3
loc646644 (p)	similar to LLP homolog	XI.12823.1.S1_at	1,3
cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	XI.548.1.S1_at	1,3
slbp	stem-loop binding protein	XI.4631.1.S1_at	1,3
fbp1 (p)	fructose-1,6-bisphosphatase 1	XI.5798.2.S1_a_at	1,2

Gensymbol	Genname	Probeset	x-fache Induktion
styx (p)	Serine/threonine/tyrosine interacting protein	XI.25499.1.S1_at	1,2
ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	XI.312.1.S1_at	1,2
Imbr1l	limb region 1 homolog-like	XI.20798.1.S1_at	1,2
hibadh (p)	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	XI.22389.1.S1_a_at	1,2
---	filamin binding LIM protein 1 (fbim1(p)) [2]	XI.10016.1.A1_at [1, 5]	1,2
---	zu 84% vergl. zu stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (serp1 (p)) [2, 3, 4]	XI.25641.1.S1_at [1]	1,2
orc6l (p)	origin recognition complex, subunit 6 like	XI.8017.1.S1_at	1,2
---	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' (snrpa1 (p)) [2, 3]	XI.23786.2.S1_a_at [1]	1,2
---	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog) (ube2d3 (p)) [2]	XI.20094.2.A1_at [1, 5]	1,2
tmem181 (p)	transmembrane protein 181	XI.10200.1.A1_at	1,2
---	hypothetical LOC495006 [2, 3]	XI.3835.1.S1_at [1]	1,2
---	Xenopus (Silurana) tropicalis protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha (ppp3r1 (p)) [3, 4]	XI.2203.1.A1_at [1]	1,2
pttg1ip (p)	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein, gene 1	XI.9539.1.S1_at	1,2
---	hypothetical protein MGC68579 [3]	XI.25984.1.A1_at [1]	1,2
---	zu 74% vergl. zu Xenopus (Silurana) tropicalis calponin 3, acidic (cnn3 (p)) [3, 4]	XI.7234.1.S1_at [1]	1,2
akirin1 (p)	akirin 1	XI.4204.3.S1_at	1,2

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. phil. nat. Gerhart U. Ryffel für die Überlassung dieses Themas sowie die ständige Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrea Vortkamp und Prof. Dr. Michael Ehrmann für den wissenschaftlichen Austausch in den Promotionskomitee-Treffen des GK.

Mein besonderer Dank gilt Sabine Senkel für die Durchführung der Zellkulturversuche und ihrer Unterstützung bei technischen Fragen zu jeder Zeit.

Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass danke ich für die Durchführung der Mikroarrays, die Diskussionsbereitschaft und die Anregungen im Arbeitsgruppenseminar.

Ein ganz großer Dank gilt dem Feinmechanikwerkstatt-Team um Herrn Ernesto Roman-Tena für die Herstellung der dünnen Platinschlaufen zum Schneiden der animalen Kappen.

Frau Dr. rer. medic. Tanja Boes danke ich sehr für die statistische Beratung.

Karin Dudziak danke ich dafür, dass sie mir den Umgang mit *Xenopus laevis* und die RNA Injektion in *Xenopus* Embryonen sowie die Immunfluoreszenz der Pronephri näher gebracht hat.

Detlef Szengel danke ich für die Pflege der adulten *Xenopus laevis*.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe III möchte ich mich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1431/1 danke ich für die lustige Zeit in Seminaren und Retreats.

Andreas, Margrit, Simone und Susanne danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Freunden und meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung und Aufmunterung in schwierigen Phasen danken. Meinen Eltern danke ich außerdem dafür, dass sie mich stets in meinem Werdegang unterstützt haben. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Das nephrogenetische Potential der Transkriptionsfaktoren *osr1*, *osr2*, *hnf1b*, *lhx1* und *pax8* in *Xenopus* animalen Kappen und ihre Vernetzung in der Nephrogenese“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christiane Drews befürworte.

Essen, den 22.09.2010

(Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 22.09.2010

(Christiane Drews)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 22.09.2010

(Christiane Drews)